

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF-1

UFAS (ALGERIE)

THESE

Présentée à la Faculté de Technologie

Département de Génie Des Procédés

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Option: Génie des polymères

Par

Mme BOUSBA-BAZID Sihem

THEME

**ETUDES SPECTRALE ET MICROSCOPIQUE DU SYSTEME
GELATINE/CARBOXYMETHYLCELLULOSE SODIQUE EN
ABSENCE ET EN PRESENCE DE NaCl, CaCl₂ et DU
GLUCOSE DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE**

Soutenue le: 21 /05/ 2015

devant le jury composé de:

M ^r . BENACHOUR. D.	Prof. à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1	Président
M ^{me} . EL KOLLI. M.	Prof. à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1	Rapporteur
M ^r . BOUNEKHEL. M.	Prof. à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1	Examinateur
M ^r . ISMAIL.F	Prof. à l'Université Badji Mokhtar de Annaba	Examinateur
M ^{me} . BOUFAS. S.	M.C.A. à l'Université de Skikda	Examinatrice
M ^{elle} . DJEDOUANI. A.	M.C.A. à l'Ecole Normale Supérieure de Constantine	Examinatrice

Remerciements

La réalisation de ce projet de doctorat a été parsemée de défis personnels et professionnels. La rédaction de cette thèse marque la fin d'une bien belle époque. Plusieurs personnes ont marqué de façon positive cette période de ma vie.

Un premier merci, je l'adresse à ma directrice de thèse qui par ses encouragements, son positivisme, a su m'accompagner lors de ces années de doctorat, qui ont été réalisées au sein du laboratoire des matériaux polymériques multiphasiques (LMPMP), sous la direction de Madame El KOLLI-MERBAH. M., Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif-1. Je la prie d'accepter mes plus respectueux remerciements pour ses conseils, ses encouragements et sa disponibilité tout au long de la réalisation de cette thèse.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur BENACHOUR. D., Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif-1, pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette soutenance.

J'adresse également ma reconnaissance à tous les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail : Professeur BOUNEKHEL. M. de l'université Ferhat Abbas Sétif-1, Professeur FADHEL. I. de l'université Badji Mokhtar de Annaba, Madame BOUFAS. S., Maître de conférences à l'université de Skikda et Mademoiselle DJEDOUANI. A., Maître de conférences à l'école normale supérieure de Constantine. Je tiens à les remercier pour avoir été les examinateurs de ce humble travail.

Je remercie vivement aussi Madame MEDJAHED. A., Maître de conférences à l'institut de mécanique (Université Ferhat Abbas Sétif-1), pour ses conseils, son aide, sa disponibilité et surtout son extrême gentillesse qu'elle m'a exprimé tout au long de la réalisation de cette thèse. Je la prie encore une fois de recevoir à travers ce travail mes sincères remerciements.

Je remercie également Mademoiselle DOUBI. H., ingénieur de laboratoire à l'institut de mécanique (Université Ferhat Abbas Sétif-1), pour sa permanente disponibilité pour la réalisation des mesures AFM. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde et sincère gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers le Professeur LOUCIF. K. à l'institut de mécanique (Université Ferhat Abbas Sétif-1), pour son soutien et sa disponibilité durant l'accomplissement des tests de DRX.

Mes remerciements s'adressent également au personnel du laboratoire de chimie minérale et plus particulièrement à Madame KHABET. G., pour sa générosité dont elle a su faire preuve malgré ses charges professionnelles.

Je tiens à dédier ce travail à la mémoire de la lumière de ma vie, ma très chère mère qui nous a quitté ca fait plus d'une année.

Merci également aux membres de ma famille notamment mon cher père, mes frères et sœurs ainsi que leurs enfants, qui ont contribué par leur présence et leur gentillesse à mon bonheur. Un merci tout spécial à mon conjoint Abdelwaheb, mes enfants : Lokman, Rayan et Adam dont l'appui et le soutien moral ont joué un rôle incontestable dans l'accomplissement de ce projet.

SOMMAIRE

Sommaire.....	i
Liste des tableaux	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	xi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1

Chapitre I: Rappels théoriques sur les polyelectrolytes et les complexes protéines-polysaccharides

I-1. Généralités sur les polyelectrolytes.....	5
I-2. Origine des polyelectrolytes.....	5
I-2-1. Polyelectrolytes synthétiques.....	6
I-2-2. Polyelectrolytes semi-naturels.....	6
I-2-3. Polyelectrolytes naturels.....	6
I-2-3-1. Polysaccharides.....	7
➤ La carboxyméthylcellulose.....	8
• Origine et structure.....	8
• Propriétés fonctionnelles de la CMC.....	10
I-2-3-2. Protéines.....	10
• Constitution des protéines.....	10
• Conformation des protéines.....	11
✓ Structure primaire.....	11
✓ Structure secondaire.....	11
❖ Hélice alpha.....	12
❖ Feuillet β	13
✓ Structure tertiaire.....	13
✓ Structure quaternaire.....	13

➤ Gélatine.....	13
• Procédé de fabrication de la gélatine.....	14
• Structure.....	14
• Tests de contrôle qualité du produit fini.....	16
✓ La force en gel (Bloom).....	16
✓ La viscosité.....	16
✓ Le pH et le point isoélectrique (pIE).....	16
• Gélatine en solution.....	17
• Applications.....	18
✓ Industries alimentaire et photographique.....	19
✓ Industrie pharmaceutique.....	19
I-3. Comportement des mélanges de biopolymères.....	20
I-4. Approche thermodynamique.....	21
I-5. Incompatibilité et comptabilité thermodynamique.....	21
1-5-1. Cas particuliers des interactions protéine/polysaccharide.....	21
I-6. Modèles théoriques développés sur la complexation.....	23
I-7. Mode de préparation en solution des complexes polyélectrolytes.....	24
I-8. Nature des interactions entre les constituants d'un complexe.....	25
I-8-1. Interactions électrostatiques.....	25
I-8-2. Interactions non-électrostatiques.....	27
I-8-3. Liaisons hydrogènes.....	28
I-8-4. Interactions hydrophobes.....	28
I-8-5. Les liaisons covalentes.....	28
I-9. Principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation de complexes protéines-polysaccharides.....	29
I-9-1. Influence du pH.....	29
I-9-2. Influence de la force ionique.....	30
I-9-3. Influence de sucres.....	32
I-9-4. Influence de la densité de charge des macromolécules.....	32

I-9-5. Influence de la masse moléculaire des biopolymères.....	33
I-9-6. Influence du ratio massique protéine : polysaccharide.....	33
I-9-7. Influence de la concentration totale en biopolymères.....	34
I-10. Influence des paramètres physiques sur la formation de complexes protéines-polysaccharides.....	34
I-10-1. Température.....	34
I-10-2. Pression.....	35
I-10-3. Agitation et temps d'agitation.....	35
I-11. Diagramme de phase.....	36
I-12. Intérêt des complexes protéines-polysaccharides.....	36

Chapitre II: Partie expérimentale

II-1. Matériels.....	39
II-2. Préparation des solutions tampons.....	39
a-solution tampon: pH 3,4 -7,8.....	39
b- solution tampon: pH 8,3 et 9,2.....	39
c-solution tampon: pH 11,7.....	39
II-3. Préparation des solutions de protéines natives.....	41
II-4. Préparation des solutions de protéines prétraitées.....	41
II-5. Préparation des solutions de polysaccharides.....	41
II-6. Préparation des mélanges protéines-polysaccharides.....	41
II-7. Méthodes.....	42
II-7-1. Détermination du point isoélectrique (pIE) de la gélatine par conductimétrie et pHmétrie.....	42
II-7-2. Spectroscopie UV-Visible.....	42
II-7-2-1. Principe.....	42
II-7-2-2. Appareil utilisé.....	43
II-7-3. Observations visuelles du mélange gélatine/NaCMC/eau.....	43
II-7-4. Elaboration des diagrammes de phases.....	44
II-7-5. Electrophorèse.....	44

II-7-5-1. Principe.....	44
II-7-5-2. Appareil utilisé.....	45
II-7-6. Spectroscopie infrarouge (IR-TF).....	45
II-7-6-1. Principe.....	45
II-7-6-2. Appareil utilisé.....	45
II-7-7. Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX).....	45
II-7-7-1. Principe.....	45
II-7-7-2. Appareil utilisé.....	47
II-7-8. Polarimétrie.....	47
II-7-8-1. Principe.....	47
➤ Cas du collagène et de la gélatine.....	48
➤ Corrections en présence d'autres composés.....	49
II-7-8-2. Appareil utilisé.....	50
II-7-9. Microscopie à force atomique (AFM).....	51
II-7-9-1. Principe.....	51
II-7-9-2. Appareil utilisé.....	54

Chapitre III: Résultats et discussion

III-1. Caractérisation des mélanges gélatine/carboxyméthylcellulose sodique.....	55
III-1-1. Variation de l'absorbance des mélanges gélatine/NaCMC/eau à 650nm en fonction du pH et du ratio.....	55
III-1-2. Observations visuelle de la séparation de phase après cinq jours et étude de la composition des deux phases obtenues.....	58
III-1-3. Etude de l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration et du pH du système natif.....	60
III-1-4. Diagrammes de phase.....	69
III-4-1-1. Système Gélatine/NaCMC.....	69
III-1-5. Suivi de la mobilité électrophorétique obtenue dans le mélange gélatine/	

carboxymethylcellulose.....	74
III-1-6. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	78
➤ L'effet dû au changement de pH.....	82
➤ L'effet dû à l'addition de la NaCMC native.....	82
➤ L'effet de l'ajout de NaCl, CaCl ₂ et du glucose.....	85
III-1-7. Diffraction des rayons X.....	90
➤ L'effet dû à l'addition de la NaCMC.....	92
➤ L'effet dû au changement de pH.....	94
➤ L'effet de l'ajout de NaCl, CaCl ₂ et du glucose.....	95
III-1-8. Etude de l'évolution des paramètres optiques en fonction de la concentration.....	100
III-1-8-1. Les principales propriétés polarimétriques.....	100
➤ Dichroïsme ou Diatténuation.....	101
➤ Polarisation.....	101
➤ Biréfringence ou retard.....	101
➤ Pouvoir de dépolarisation.....	101
III-1-8-2. Etude polarimétrique des solutions natives à différents pH.....	101
➤ Le suivi du degré de polarisation lors de l'ajout de la NaCMC à la gélatine.....	103
➤ L'effet des sels et du glucose sur le pouvoir diffusant des solutions G/NaCMC.....	105
III-1-8-3. Mesure de l'hélicité de la gélatine par polarimétrie.....	107
III-1-9. Etude morphologique du mélange G/NaCMC en absence et en présence de NaCl, CaCl ₂ et du glucose.....	111
➤ Effet de la concentration sur les microstructures.....	112
➤ Effet de l'ajout de NaCl.....	116
➤ Effet de l'ajout de CaCl ₂	117
➤ Effet de l'ajout du glucose.....	117
➤ Effet dû au changement de pH.....	119

➤ Effet additionnel dû au changement du pH et l'ajout des sels (NaCl, CaCl ₂) et du glucose.....	120
Conclusion.....	123
Références bibliographiques.....	126
Annexes.....	145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Différentes fractions en acides aminés entrant dans la composition de la gélatine.

Tableau I.2: Exemples de Blooms par application.

Tableau I.3: Caractéristiques des gélatines.

Tableau 1.4: Exemples d'application des complexes protéines-polysaccharides.

Tableau II.1: préparation des solutions tampons pH (3,4-7,8).

Tableau II.2: Préparation des solutions tampons pH (8,3 et 9,2).

Tableau II.3: préparation des solutions tampons de pH (11,7).

Tableau II.4: Les différentes valeurs de conductivité et de pH pour une solution de gélatine obtenues par conductimétrie couplée à la pH métrie.

Tableau III.1: Diamètre inter réticulaire de la NaCMC native.

Tableau III.2: Diamètres inter réticulaire de la G_{native} et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}$.

Tableau III.3: Diamètres inter réticulaire de la $(G_{\text{pH } 4,2})$ et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{pH } 4,2}$.

Tableau III.4: Diamètres inter réticulaire de la G_{native} et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}$ en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableau III.5: Diamètres inter réticulaire de la $(G_{\text{pH } 4,2})$ et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{pH } 4,2}$ en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableau III.6: Diamètres inter réticulaire de la $(G_{\text{pH } 5,2})$ et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{pH } 5,2}$ en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableau III.7: Diamètres inter réticulaire de la $(G_{\text{pH } 7,0})$ et du mélange $(G/\text{NaCMC})_{\text{pH } 7,0}$ en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.8: Les valeurs de pouvoir rotatoire spécifique et le taux de la triple hélice de la gélatine native et du mélange natif en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.9: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 4,2 et du mélange pH 4,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableau III.10: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 5,2 et du mélange pH 5,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.11: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 7,0 et du mélange pH 7,0 en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.12: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée et du mélange en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.13: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 4,2 et du mélange pH 4,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl_2 et glucose.

Tableaux III.14: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 5,2 et du mélange pH 5,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.....

Tableaux III.15: Les valeurs de pouvoir rotatoire spécifique et le taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 7,0 et du mélange pH 7,0 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Tableau III.16: Différentes dimensions des microstructures calculées par AFM pour la gélatine et différents mélanges.

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: Structures chimiques de polycations et de polyanions synthétiques utilisés dans la complexation.

Figure I.2: Représentation schématique d'une chaîne de cellulose.

Figure I.3: Structures chimique de la carboxymethylcellulose de sodium.

Figure I.4: Schéma représentatif des différentes structures d'une protéine.

Figure I.5: Equilibre de charges au point isoélectrique.

Figure I.6: Comportement des mélanges protéines-polysaccharides.

Figure I.7: Modèles de structure des polyelectrolytes: Echelle « ladder », œuf-brouillé «scrambled egg ».

Figure I.8: Illustration de l'interaction électrostatique entre deux charges Q_1 et Q_2 .

Figure 1.9: Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH. Les cercles bleus représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polysaccharide. pH_c : pH critique, $pH\emptyset$: pH de séparation de phase.

Figure I.10: Représentation d'un diagramme de phases.

Figure II.1: Détermination du point isoélectrique de la gélatine par conductimétrie couplée à la pHmétrie.

Figure II.2: Schéma de la méthode de mesure par polarimétrie.

Figure II.3: Schéma représentatif d'un polarimètre de Mueller.

Figure II.4: Schéma simplifié de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

Figure III.1: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,1 wt% et à différents ratios.

Figure III.2: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,5 wt% et à différents ratios.

Figure III.3: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/ NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,75 wt% et à différents ratios.

Figure III.4: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/ NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 1 wt% et à différents des ratios.

Figure III.5: Séparation de phase obtenue à différents ratios $Pr : Ps$ du mélange gélatine/ Na CMC/eau à 1%, après 5 jours à pH 4,2.

Figure III.6: Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps de mélange gélatine/ Na CMC/eau à 1%, après 5 jours à pH (a) 6,8, (b) 7,8 et (c) 8,3.

Figure III.7: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 4,2.

Figure III.8: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 5,2.

Figure III.9: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 7,0.

Figure III.10: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0.3 M) à pH 4,2.

Figure III.11: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0.3 M) à pH 5,2.

Figure III.12: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0.3 M) à pH 7,0.

Figure III.13: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH 4,2.

Figure III.14: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH 5,2.

Figure III.15: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH 7,0.

Figure III.16: Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en fonction de la concentration et du pH.

Figure III.17: Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de NaCl (2M).

Figure III.18: Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de CaCl₂ (0.3M).

Figure III.19: Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de glucose (2M).

Figure III.20: Eléctrophérogrammes de la gélatine seule (A) et des mélanges G/NaCMC à différents ratios: B (1 :1), C (2 :1), D (4 :1) E (8 :1) en absence de NaCl.

Figure III.21: Eléctrophérogramme de la gélatine seule (A) et des mélanges G/NaCMC à différents ratios: B (1 :1), C (2 :1), D (4 :1) et en présence de NaCl.

Figure III.22: Spectres infrarouge: (a) NaCMC native pH 6,83; (b) NaCMC pH 4,2 (c) NaCMC pH 5,2; (d) NaCMC pH 7,0.

Figure III.23: Spectres infrarouge: (a) Gélatine native pH 5,13; (b) Gélatine pH 4,2 ; (c) Gélatine pH 5,2; (d) Gélatine pH 7,0.

Figure III.24: Spectres infrarouge: (a) (G/ NaCMC)_{natif}; (b) (G/ NaCMC)_{pH 4.2}; (c) (G/ NaCMC)_{pH 5.2}; (d) (G/ NaCMC)_{pH 7.0}.

Figure III.25: Les différents types d'interactions susceptibles de stabiliser les structures protéiques.

Figure III.26: Réaction de Maillard.

Figure III.27: Spectres infrarouge: (a) G_{native}; (b) (G/ NaCMC)_{natif}; (c) ((G/ NaCMC)_{natif} / NaCl); (d) ((G/ NaCMC)_{natif} / CaCl₂); (e) ((G/ NaCMC)_{natif} / glucose).

Figure III.28: Spectres infrarouge: (a) G_{pH 4.2}; (b) (G/ NaCMC)_{pH 4.2}; (c) ((G/ NaCMC)_{pH 4.2} / NaCl); (d) ((G/ NaCMC)_{pH 4.2} / CaCl₂); (e) ((G/ NaCMC)_{pH 4.2} / glucose).

Figure III.29: Spectres infrarouge: (a) G_{pH 5.2}; (b) (G/ NaCMC)_{pH 5.2}; (c) ((G/ NaCMC)_{pH 5.2} / NaCl); (d) ((G/ NaCMC)_{pH 5.2} / CaCl₂); (e) ((G/ NaCMC)_{pH 5.2} / glucose).

Figure III. 30: Spectres infrarouge: (a) G_{pH 7.0}; (b) (G/ NaCMC)_{pH 7.0}; (c) ((G/ NaCMC)_{pH 7.0} / NaCl); (d) ((G/ NaCMC)_{pH 7.0} / CaCl₂); (e) ((G/ NaCMC)_{pH 7.0} / glucose).

Figure III.31: Diffractogramme des rayons X de NaCMC native.

Figure III.32: Diffractogramme des rayons X de la gélatine native.

Figure III.33: Diffractogramme des rayons X du mélange (G/NaCMC)_{natif}.

Figure III.34: Diffractogramme des rayons X de la gélatine à pH 4.2 (G_{pH 4.2}).

Figure III.35: Diffractogramme des rayons X du mélange (G/NaCMC)_{pH 4.2}.

Figure III.36: Diffractogramme des rayons X de la G_{native} et du mélange (G/NaCMC)_{natif} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Figure III.37: Diffractogramme des rayons X de la (G_{pH 4.2}) et du mélange (G/NaCMC)_{pH 4.2} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Figure III.38: Diffractogramme des rayons X de la (G_{pH 5.2}) et du mélange (G/ NaCMC)_{pH 5.2} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Figure III.39: Diffractogramme des rayons X de la (G_{pH 7.0}) et du mélange (G/ NaCMC)_{pH 7.0} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Figure III.40: Evolution du degré de polarisation de la gélatine à différents pH en fonction de la concentration.

Figure III.41: Evolution du degré de polarisation du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

Figure III.42: Evolution du dichroïsme du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

Figure III.43: Evolution du retard du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

Figure III.44: Evolution du degré de polarisation de la gélatine, du mélange à pH 4.2 en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose en fonction de la concentration.

Figure III.45: Schéma de la méthode de mesure par polarimétrie.

Figure III.46: Image par AFM de la gélatine native.

Figure III.47: Image par AFM de la NaCMC native.

Figure III.48: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_n.

Figure III.49: Image par AFM du mélange (G_n/NaCl).

Figure III.50: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_n/NaCl.

Figure III.51: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_n/CaCl₂.

Figure III.52: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_n/glucose.

Figure III.53: Image par AFM de la gélatine à pH 4.2 (G_{pH 4.2}).

Figure III.54: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_{pH 4.2}.

Figure III.55: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_{pH 4.2}/NaCl.

Figure III.56: Image par AFM du mélange (G/NaCMC)_{pH 4.2}/CaCl₂.

Figure III.57: Image par AFM de la (G/NaCMC)_{pH 4.2}/glucose.

LISTE DES ABREVIATIONS

wt %: Concentration totale en biopolymère.

CMC: Carboxyméthylcellulose.

NaCMC: Carboxyméthylcellulose sodique.

DS: degré de substitution.

NaCMC_n: Carboxyméthylcellulose sodique natif.

G: la gélatine.

G_n: la gélatine native.

G/NaCMC: mélange de gélatine et de Carboxyméthylcellulose sodique.

Gd: la gélatine dénaturée.

Gly: la glycine.

Pro: la proline.

Hyp: l'hydroxyproline.

pIE: le point isoélectrique.

PEE: pH d'équivalence électrique.

pH_c: pH de formation des complexes macromoléculaires.

pH_∅: pH de séparation de phase macroscopique.

Pr: Ps : ratio protéine : polysaccharide.

PA: Polyanion.

PC: Polycation.

β-Ig: β-lactoglobuline.

glu: glucose.

D: le dichroïsme.

P: la polarisation.

R: le retard.

AFM: microscope à force atomique.

Ra: la rugosité arithmétique moyenne.

Rq: la rugosité quadratique moyenne.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les consommateurs du monde industrialisé sont de plus en plus conscients de la relation entre l'alimentation et la santé. De ce fait, la demande pour une alimentation équilibrée et des produits alimentaires fonctionnels qui répondent à des besoins spécifiques de santé est en croissance constante. De telles attentes ont suscité le développement d'aliments apportant une valeur ajoutée au-delà de leur simple valeur nutritive en ajoutant à ces aliments des ingrédients bioactifs (**Benshitrit *et al.*, 2012**).

L'un des défis majeur de l'industrie alimentaire est de fournir des produits répondant aux besoins nutritionnels tout en leur associant d'autres propriétés, un effet bénéfique sur la santé et un goût amélioré (**Sagalowicz *et al.*, 2010**). On constate ainsi une demande croissante de la part des industriels pour des produits complexes aux propriétés nutritionnelles et organoleptiques maîtrisées.

Ces produits alimentaires que nous consommons sont transformés en formant des systèmes complexes structurés par un ensemble d'ingrédients sont souvent composés d'ingrédients tels que les protéines et les polysaccharides à cause de leurs propriétés épaississantes, gélifiantes, stabilisantes et émulsifiantes. Les paramètres qui influencent les propriétés de chacun de ces biopolymères sont la masse molaire, la polymolécularité, la conformation chimique, la concentration, le pH, la force ionique, la température, la qualité du solvant et enfin la nature et la force des interactions intermoléculaires et intramoléculaires.

Au cours de la transformation de ces aliments, ces éléments structuraux peuvent être modifiés conférant ainsi au système de nouvelles fonctionnalités. Les interactions existant entre ces différents composants déterminent la structure finale, la texture et la stabilité du produit obtenu. Ces critères définissent en outre la qualité du produit fini. Une meilleure connaissance de la structure et des propriétés physico-chimiques des composants a ainsi conduit à des applications différenciées et spécifiques.

Lorsque ces deux biopolymères sont mélangés, les propriétés physico-chimiques deviennent plus complexes. La stabilité et la microstructure des produits ne dépendent plus

seulement des propriétés physico-chimiques des protéines ou des polysaccharides isolés mais aussi de la nature et de la force des interactions entre les deux constituants. Ces interactions affectent les propriétés structurales, rhéologiques, physico-chimiques et la stabilité des mélanges **(Merveille, 2011)**.

De manière générale, les mélanges de biopolymères (protéines et les polysaccharides) en solution aqueuse sont caractérisés par une instabilité due à une prévalence des contributions entropiques sur les contributions enthalpiques, du fait de la masse moléculaire élevée de ces macromolécules. Cette instabilité se traduit macroscopiquement par une séparation de phase et conduit, en fonction de l'équilibre entre les différents types d'interactions solvant-solvant, solvant-biopolymère ou biopolymère-biopolymère, à deux phénomènes bien distincts **(Schmitt, 2000)**.

Les protéines et les polysaccharides correspondent aux deux biopolymères les plus fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire pour contrôler les propriétés mécaniques, structurales ainsi que la stabilité et les propriétés organoleptiques des produits **(Dickinson & Mc Clements, 1996)**. Les propriétés texturantes et structurantes de ces deux types de polymères en mélange dépendent de leurs interactions et de leurs capacités à former des structures organisées **(Tolstoguzov, 1991)**. D'un point de vue industriel, une meilleure compréhension des mélanges protéines/polysaccharides représente un enjeu important car ils sont déjà largement mis en jeu dans les produits alimentaires transformés **(Norton & Frith, 2001)**. C'est dans ce contexte que nous avons choisi de travailler sur un système modèle, composé d'un mélange protéine fibreuse/polysaccharide anionique.

Pour notre étude, nous avons considéré un système ternaire modèle constitué d'une protéine animale (bovine), la gélatine, d'un polysaccharide végétal, la carboxyméthylcellulose sodique et du solvant le plus largement rencontré dans le domaine alimentaire, l'eau.

Le choix de la gélatine s'explique pour plusieurs raisons. Il s'agit tout d'abord d'une protéine très largement utilisée comme ingrédient alimentaire du fait de ses propriétés tensio-actives et gélifiantes. D'autre part, on peut l'obtenir assez facilement en grandes quantités à un état de pureté élevé. De plus, la structure moléculaire de la gélatine est à l'heure actuelle très bien connue ce qui fait que nous pourrions suivre l'évolution de celle-ci après complexation avec la carboxyméthylcellulose sodique.

Avec une production annuelle de 330 000 tonnes, la gélatine est devenue un produit de consommation usuelle que l'on retrouve pratiquement dans tous les domaines de la vie moderne. L'intérêt pour cette macromolécule a été croissant, tant les avantages sont importants dans la consommation courante: pas de toxicité, quantité abondante de matières premières disponibles, choix de différentes qualités pour chaque application, compatibilité avec d'autres constituants dans de nombreuses formulations, etc (**Rbii, 2010**).

Ses propriétés fonctionnelles uniques font de la gélatine un des ingrédients importants de l'industrie alimentaire, photographique, cosmétique et pharmaceutique (**Schrieber et Gareis, 2007 ; Segtnan et al., 2003**).

La carboxyméthylcellulose sodique a également aussi été retenue du fait de son utilisation intensive dans l'industrie alimentaire car elle possède des capacités stabilisantes, épaississantes de contrôle de cristallisation et de rétention d'eau. Elle est d'ailleurs largement utilisée dans un grand nombre de procédés d'encapsulation faisant appel au phénomène de coacervation complexe.

Les objectifs principaux de ce travail est de mettre l'accent sur les paramètres susceptibles d'influencer les interactions entre les deux biopolymères. Dans cette perspective nous cherchons à déterminer le pH et le ratio optimum pour lesquels les interactions sont à leurs maximums entre la gélatine et la carboxyméthylcellulose sodique.

Dans un autre contexte de cette étude le comportement de la gélatine vis-à-vis de la NaCMC, NaCl, CaCl₂ et le glucose a été considéré sous l'influence de la concentration totale en biopolymères.

Le but étant de comprendre les mécanismes possibles mis en jeu en fonction de la nature des mélanges obtenus. D'un point de vue fondamental, il est clair que l'effet protecteur de la NaCMC sur la gélatine et les modifications conformationnelles de l'hélice α sont fortement influencés par la nature du milieu. Notre objectif est de minimiser au maximum les changements de structure de l'hélice α pour maintenir la gélatine plus stable et la protéger contre la dénaturation qui se manifeste durant les procédés de transformation notamment dans le domaine alimentaire.

Dans le but d'étudier la nature des interactions et d'évaluer les propriétés des mélanges plusieurs techniques ont été utilisées à savoir l'(UV-Vis), l'élaboration des digrammes de phases, l'électrophorèse, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), le suivi

de l'évolution des paramètres optiques ainsi que du taux d'hélicité de la gélatine par polarimétrie et enfin une étude morphologique par le microscope à force atomique (AFM).

Pour une étude détaillée et approfondie de cette problématique, le document présenté ici se compose de trois chapitres.

Ainsi, le premier chapitre débute par des rappels sur les polyélectrolytes et leur origine, ainsi qu'une revue générale sur les connaissances acquises sur les biopolymères à l'étude telles que la gélatine et la carboxyméthylcellulose sodique qui ont été évoquées et détaillées dans le premier volet de ce chapitre.

Par contre, le second volet de ce même chapitre est essentiellement consacré à une revue bibliographique des études concernant les complexes protéines-polysaccharides. Il débute en rappelant les bases théoriques de la stabilité des solutions macromoléculaires, puis fait le point sur l'état des connaissances sur les types d'interactions se produisant dans les complexes protéine-polysaccharide, l'influence des paramètres physiques et physico-chimiques.

Le deuxième chapitre, comprend dans un premier temps les matériaux utilisés, à savoir la gélatine et la carboxyméthylcellulose sodique ainsi que les réactifs exploités. En second lieu une description détaillée des méthodes expérimentales utilisées dans cette étude.

Le troisième chapitre est consacré à l'ensemble des résultats obtenus à partir des différents tests effectués et la discussion de ceux-ci à la lumière des données bibliographiques disponibles.

CHAPITRE I
RAPPELS THEORIQUES SUR LES
POLYELECTROLYTES ET LES
COMPLEXES
PROTEINES-POLYSACCHARIDES

I-1. Généralités sur les polyélectrolytes

Les polymères sont des molécules composées d'un très grand nombre de maillons élémentaires appelés monomères. Lorsque ces monomères sont chargés, on parle de polyélectrolytes. On peut les considérer comme étant des polymères ioniques comportant un grand nombre de sites ioniques et ayant une continuité des régions d'interactions ioniques. Leur présence leur confère la possibilité de faire partie de notre quotidien. On les trouve dans nos produits cosmétiques, au sein de notre nourriture ou entrent dans la composition ou le métabolisme des organismes (ADN, hyaluronane...) (**Onesippe, 2005**). Les polyélectrolytes se caractérisent par leurs groupements ionisés et/ou ionisables qui se dissocient et sont généralement solvatés dans des solvants polaires. La plupart de ces polyélectrolytes sont donc solubles dans des solvants polaires comme l'eau, le polymère se dissocie, et apparaissent ensuite des charges sur son squelette et des contre-ions en solution. La charge est dépendante des groupements chimiques présents et parfois du pH de la solution (**Baigl, 2003**). Contrairement aux électrolytes, la coexistence à courte distance des charges sur un polymère lui confère des propriétés physico-chimiques très particulières assez différentes de celles des polymères neutres. La conséquence la plus importante est sans doute la grande rigidité adoptée par la chaîne, qui est due aux répulsions électrostatiques (**Lavalle et al., 2005**). Ces composés macromoléculaires peuvent être classés selon leur fonctions ionisées et/ou ionisables sous différentes catégories:

- Selon leurs origines (synthétique, semi-naturelle et naturelle);
- Selon la nature de leurs charges (positives ou négatives, permanentes ou modulables);
- Selon leurs interactions avec le solvant (hydrophile, amphiphile, hydrophobe).

I-2. Origine des polyélectrolytes

Les polyélectrolytes peuvent être synthétiques, semi-naturels ou naturels. Les polyélectrolytes synthétiques ont l'avantage d'être produits en grande quantité, de présenter une grande régularité dans l'enchaînement des monomères ou d'avoir une haute pureté.

Une autre catégorie dite intermédiaire, les polyélectrolytes semi-naturels qui sont issus de la modification chimique de polymères naturels.

Il existe également les polyélectrolytes naturels qui doivent être extraits puis purifiés. Ils peuvent présenter des structures chimiques assez complexes (par exemple la structure rigide

du xanthane) (**Bejenariu et al., 2009**) et sont souvent polymoléculaires et parfois assez ramifiés. Ils sont néanmoins très utilisés dans des applications spécifiques grâce à leur biocompatibilité et/ou leur biodégradabilité. Ils sont de plus en plus employés dans l'élaboration de nouveaux matériaux destinés à des applications médicales et cosmétiques par exemple.

I-2-1. Polyélectrolytes synthétiques

Les polyélectrolytes naturels se trouvent souvent en petite quantité et leur extraction demande de grands efforts de purification. Par ailleurs, leur structure chimique est souvent très complexe et peu régulière (polydispersité, ramifications). C'est pourquoi la majorité des polyélectrolytes utilisés sont des polyélectrolytes synthétiques. Ces derniers sont obtenus principalement par polymérisation en étapes (polycondensation) ou par polymérisation en chaîne (polymérisation ionique, radicalaire). Les (poly-diallyldiméthylammonium) (PDADMA) ainsi que les poly (vinylbenzyltriméthylammonium) (PVBMA) sont des polycations synthétiques très étudiés notamment dans la complexation (**Hamano et al., 1998; Petzold et al., 1998**). Les poly (styrène) sulfonates (PSS) sont retenus comme exemples de polyélectrolytes anioniques synthétiques. Ils sont utilisés en particulier dans les piles à combustible (**Chen et al., 2004**). Les poly (phosphates) (PP) sont des polymères anioniques exploités dans la complexation pour la délivrance de principes actifs (**Kargina et al., 1999**). Leur structure chimique respective est présentée dans la **Figure I.1**.

I-2-2. Polyélectrolytes semi-naturels

De nombreux polysaccharides neutres sont modifiés afin de devenir des polyélectrolytes. Ces polyélectrolytes semi-naturels peuvent également être modifiés au niveau de leur amphiphilie par incorporation de groupes apolaires ouvrant la voie aux systèmes associatifs d'origine naturelle à l'instar des polyélectrolytes associatifs d'origine synthétiques. Un exemple peut être cité est la carboxyméthylcellulose (CMC) qui peut être hydrophobisée (**Charpentier et al., 1997**).

I-2-3. Polyélectrolytes naturels

Les polysaccharides, les protéines et les polynucléotides sont à nos jours les polymères naturels les plus présents et les plus connus. La gélatine, protéine animale très utilisée dans l'industrie alimentaire, est un exemple de polyélectrolyte cationique pour des pH inférieurs à 8. Elle peut se complexer à plusieurs polysaccharides, notamment au sodium dodecylsulfate (**Buron et al., 2004**). Les polyélectrolytes sont principalement anioniques. L'alginate et l'acide hyaluronique en sont des exemples. L'acide hyaluronique est très étudié en

cosmétologie et également en oncologie de part son implication dans les tumeurs cancéreuses (Stern, 2005).

I-2-3-1. Polysaccharides

Sachant que les polysaccharides sont considérés comme étant des polyelectrolytes naturels, ils possèdent une variété infinie de propriétés, parmi celles-ci est leur capacité à entrer en interaction avec d'autres matériaux. C'est un processus assez connu dans les systèmes macromoléculaires. Les polysaccharides peuvent interagir avec les protéines fibreuses et globulaires pour former des complexes solubles et insolubles qui sont principalement stabilisés par des interactions électrostatiques, ions-dipôles ou hydrophobes d'une part.

D'autre part, on peut considérer que la vie sur terre telle qu'on la connaît repose sur la coexistence d'eau et de molécules organiques possédant un squelette carbone. Les molécules de base qui assurent l'association d'atomes de carbone avec des molécules d'eau sont les glucides qu'on peut formellement noter $C_n (H_2O)_p$. Lorsqu'il s'agit de molécules simples, on parle d'oses. Le principal d'entre eux est le glucose, $C_6H_{12}O_6$, de saveur sucrée et contenu dans certains fruits comme le raisin. Le glucose est synthétisé par les plantes à partir du dioxyde de carbone de l'air, d'eau et d'énergie solaire (photosynthèse). Le glucose emmagasine ainsi une énergie réutilisable qui est fondamentale au métabolisme des êtres vivants. Lorsqu'un grand nombre d'oses est associé pour former un enchainement macromoléculaire, on parle de polyoside, de polyholoside ou de polysaccharide. Ces derniers sont une forme de glucides appelés aussi sucres, glucanes ou polyosides; ils sont formés par la condensation d'unités glucidiques (Berand, 2001).

Ils sont considérés comme étant les macromolécules les plus abondantes sur terre et dans les océans. Ces macromolécules sont les éléments structuraux majeurs essentiels de la paroi des végétaux (ex: cellulose, carraghénanes, alginates). Ils ont également un rôle essentiel dans le stockage de l'énergie (ex: amidon).

Les polysaccharides sont des substrats solides qui se présentent sous forme de fibres, de granules ou de gels dont les propriétés physico-chimiques et structurales sont intimement liées à leurs structures chimiques et, par conséquent, à leurs biosynthèses.

Les polysaccharides fortement utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, pour leurs propriétés technologiques, physiologiques et pharmaceutiques, ont un rôle primordial dans l'économie mondiale (Nyström *et al.*, 1999).

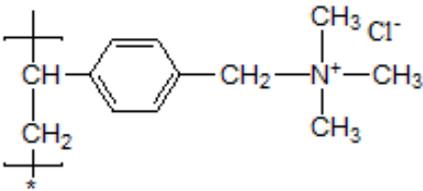
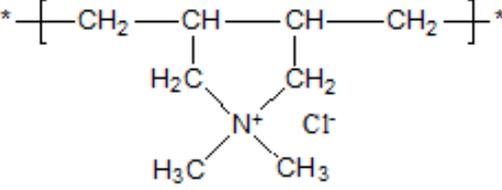
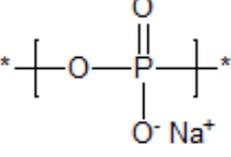
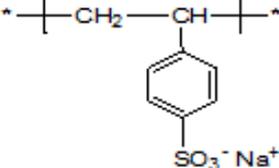
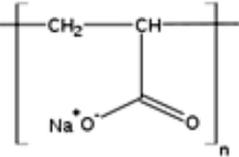
<p>Chlorure de poly(vinylbenzyltriméthylammonium) (PVBMA)</p>  <p>Chlorure de polydiallyldiméthylammonium (PDADMA)</p> 	<p>Polyphosphate de sodium inorganique (PP)</p>  <p>Polystyrène sulfonate de sodium (PSS)</p>  <p>Polyacrylate de sodium (PAA)</p> 
<p>Polycations</p>	<p>Polyanions</p>

Figure I.1: Structures chimiques de polycations et de polyanions synthétiques utilisés dans la complexation (Pépin, 2010).

➤ La carboxyméthylcellulose

Parmi la diversité des polysaccharides qui existe nous citons en revue la carboxyméthylcellulose étant donné que c'est le polysaccharide qui a été utilisé dans cette étude.

• Origine et structure

La carboxyméthylcellulose sodique est intensivement utilisée dans l'industrie alimentaire car elle possède des capacités stabilisantes, épaississantes de contrôle de cristallisation. Elle est considérée comme étant le polysaccharide le plus couramment utilisé dans le domaine alimentaire en présence surtout de protéines et ceci pour assurer leur protection, plus

particulièrement contre la dénaturation lors des différents processus de transformation des aliments (Coffey *et al.*, 1995).

Elle est aussi dénommée CMC, NaCMC, CMC sodique, gomme cellulosique ou sel de sodium de l'éther carboxyméthyle de cellulose. Sa formule chimique générale est la suivante: $C_6H_7O_2(OR_1)(OR_2)(OR_3)$ où R_1 , R_2 et R_3 peuvent être: H; $CH_2COO^- Na^+$ ou CH_2COOH . Ce polysaccharide anionique linéaire qui dérive de la cellulose est majoritairement extrait d'un co-produit de l'industrie du coton et des pulpes de bois. La cellulose, provenant des parois des cellules végétales, est le polysaccharide de structure le plus abondant. Sa structure est celle d'un agrégat linéaire de polymères de D-glucopyranosyle relié par des liens β -1,4 (Figure I.2). La résistance de la cellulose ainsi que son insolubilité dans l'eau sont dues en partie aux nombreux liens hydrogènes reliant les agrégats par l'intermédiaire des groupements hydroxyles. À l'état solide, la cellulose est composée de zones cristallines très organisées et de zones amorphes dont les groupes réactifs sont plus accessibles (Coffey *et al.*, 1995).

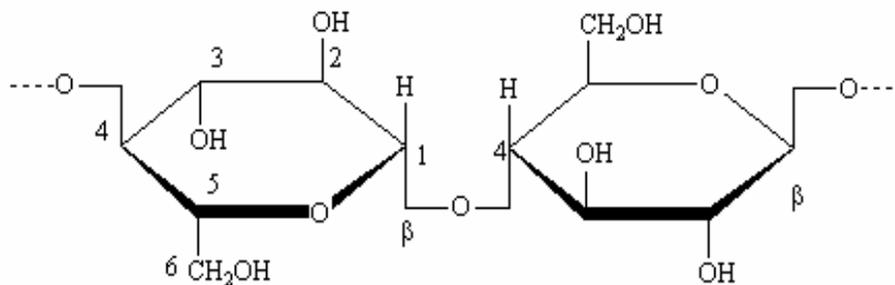


Figure I.2: Représentation schématique d'une chaîne de cellulose (Zugenmaier, 2001).

On obtient la carboxyméthylcellulose en traitant la cellulose en milieu alcalin afin de briser les liens hydrogènes responsables de l'union des chaînes de polymères, en commençant par les zones amorphes. Suite à ce traitement, du monochloroacétate est ajouté à la cellulose hydratée afin d'obtenir le dérivé CMC (Figure I.3). Le pK_a de la molécule obtenue se situe entre 4,2 et 3,4 (Keller, 1986). Globalement, certains des groupements hydroxyles de la cellulose se sont trouvés substitués par des groupements carboxyméthyles. Le nombre de ces groupements carboxyméthyles par unité anhydroglucose est appelé le degré de substitution (DS). Le CMC de qualité alimentaire est d'un DS égal ou inférieur à 0,95 (Coffey *et al.*, 1995), d'une viscosité minimale de 25 cps lorsqu'il est en solution à 2% à 25°C et d'une pureté minimale de

99,5% sur base sèche (**Ganz, 1977**) et Son poids moléculaire peut être évalué par la mesure de la viscosité, il est compris entre 17,000 et 300,000 (**Keller, 1984**).

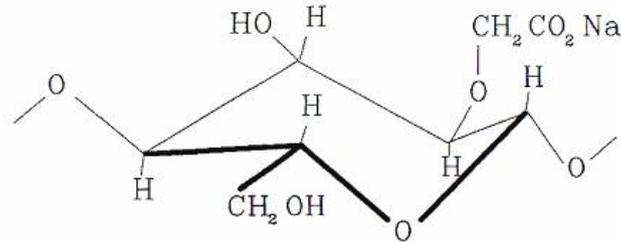


Figure I.3: Structures chimique de la carboxymethylcellulose de sodium (**Coffey et al., 1995**).

- **Propriétés fonctionnelles de la CMC**

La CMC est utilisé principalement pour ses capacités stabilisantes, épaississantes de contrôle de cristallisation et de rétention d'eau (**Coffey et al., 1995**). Les desserts congelés, les produits de boulangerie, les sauces à salade, les sirops, les boissons, les aliments extrudés et les aliments réduits en calories sont des exemples d'aliments comptant le CMC parmi leurs ingrédients (**Perez et Mazeau, 2005**). Les propriétés fonctionnelles de ce polysaccharide anionique peuvent être modifiées en présence de protéines avec les quelles il peut interagir.

Nous nous proposons dans ce qui suit, de présenter la gélatine plus en détail, notamment le mode d'obtention, les caractéristiques, mais aussi les propriétés et les multiples applications de celle-ci.

La gélatine est obtenue par dégradation du collagène qui est la protéine la plus répandue chez les mammifères, car le collagène est le constituant majeur des tissus conjonctifs et des matrices des os. On la retrouve également chez les poissons, les oiseaux, etc.

Avant d'exposer les caractéristiques de la gélatine, nous élucidons un bref rappel sur la structure des protéines.

I-2-3-2. Protéines

- **Constitution des protéines**

Ce sont des polymères organiques résultant de la condensation d'acides aminés par formation de liaisons peptidiques. Les acides aminés constitutifs sont appelés résidus. Le radical R présent sur le résidu est appelé chaîne alkyle (**Rbii, 2010**).

Deux acides aminés peuvent s'associer de façon covalente pour former un dipeptide. La liaison ainsi établie est la liaison peptidique, qui résulte de la combinaison entre le groupement carboxyle (COOH) d'un acide aminé et le groupement amine (NH₂) de l'autre, avec perte d'une molécule d'eau. La répétition de cette réaction n fois, permet ainsi d'obtenir un peptide ($n < 100$) ou une protéine ($n > 100$) (**Baigl, 2003**).

La séquence d'acides aminés, ou structure primaire, détermine presque à elle seule les propriétés physico-chimiques et structurales des protéines, en particulier ses interactions avec l'eau. Les protéines interagissent avec l'eau par leurs liaisons peptidiques (interactions dipôle dipôle ou liaison hydrogène) ou par les chaînes latérales (interactions avec les groupements polaires, ionisés et même non polaires) (**Rbii, 2010**).

- **Conformation des protéines**

Chaque protéine est caractérisée par sa conformation, c'est-à-dire son organisation tridimensionnelle: les protéines fibreuses comme la gélatine, sont composées de chaînes polypeptidiques assemblées le long de l'axe commun (collagène, kératine...). Les protéines globulaires sont formées de chaînes enroulées sur elles-mêmes engendrant des formes sphériques ou ellipsoïdales (sérum albumine). Le rôle biologique de ces protéines ne peut être maintenu que si l'organisation tridimensionnelle est respectée. Il existe quatre niveaux structuraux chez les protéines, de la structure primaire à la structure quaternaire (**Figure I.4**) (**Chevalier, 2005**).

- ✓ **Structure primaire**

La structure primaire est la séquence peptidique. C'est la seule structure parmi les autres structures à être codée génétiquement, elle détermine les trois autres niveaux structuraux.

La conformation privilégiée de la liaison peptidique entre les résidus est en *trans*. Cette conformation est généralement plus stable car elle positionne les chaînes latérales loin l'une de l'autre (**Chevalier, 2005**).

- ✓ **Structure secondaire**

C'est le premier stade de l'organisation dans l'espace d'une chaîne peptidique. Ce sont des structures qui sont stabilisées par la présence de nombreuses liaisons hydrogène entre les groupements C=O et NH du squelette (**Chevalier, 2005**).

On distingue : les hélices α , les feuillets β , les coudes β .

- ❖ **Hélice alpha**

L'hélice alpha est une structure secondaire représentée par une spirale qui s'observe dans des portions de protéines. Elle est formée par la rotation régulière d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Elle est stabilisée dans sa forme hélicale par des ponts hydrogènes établis entre l'hydrogène d'un groupement aminé -NH et l'oxygène d'un groupement carboxylique C=O. Le cœur de l'hélice alpha est donc hydrophobe, ce qui n'est pas forcément le cas des chaînes latérales. Les hélices alpha sont rigides, par opposition aux autres parties de la protéine qui sont dans une conformation de pelote statistique (Soury-Lavergne Navizet, 2004).

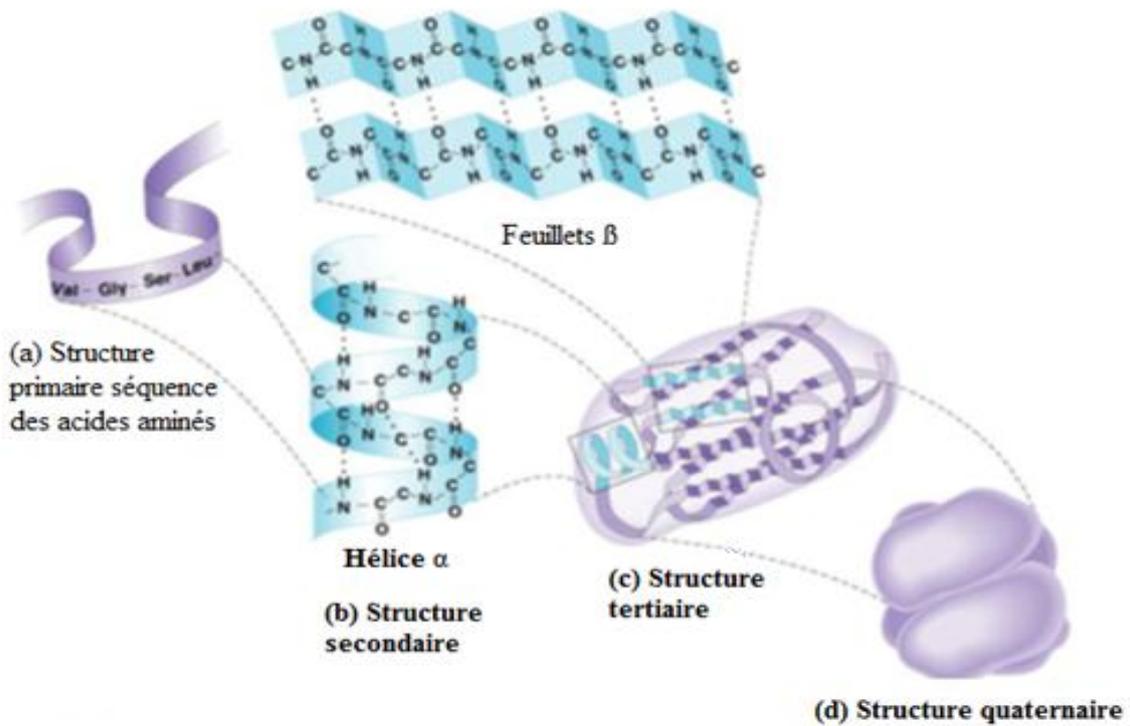


Figure I.4: Schéma représentatif des différentes structures d'une protéine (Chevalier, 2005).

❖ Feuillet β

Dans les feuillets bêta (β), les liaisons hydrogène intermoléculaires stabilisent l'alignement ordonné des chaînes peptidiques. On parle de feuillets beta parallèles quand les chaînes vont dans le même sens et d'antiparallèles quand elles vont dans des directions opposées. Ils ne donnent pas d'élasticité à la structure (**Soury-Lavergne Navizet, 2004**).

✓ **Structure tertiaire**

La structure tertiaire d'une protéine est sa disposition tridimensionnelle: c'est la donnée de l'agencement des structures secondaires et de l'organisation spatiale des chaînes latérales (**Soury-Lavergne Navizet, 2004**).

✓ **Structure quaternaire**

La structure quaternaire est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Elle concerne les protéines constitués de plusieurs chaînes polypeptidiques et détermine l'arrangement spatial des différentes sous-unités entre elles (**Soury-Lavergne Navizet, 2004**).

➤ **Gélatine**

Le choix de la gélatine, s'explique pour plusieurs raisons. Il s'agit tout d'abord d'une protéine très largement utilisée comme ingrédient alimentaire du fait de ses propriétés tensio-actives et gélifiantes. De plus, la structure moléculaire de la gélatine est actuellement très bien connue ce qui fait que nous pourrions suivre l'évolution de celle-ci après sa complexation avec diverses macromolécules à savoir la carboxyméthylcellulose sodique.

L'intérêt pour cette macromolécule a été croissant surtout ces dernières années, tant les avantages sont importants dans la consommation courante: pas de toxicité, quantité abondante et disponible de matières premières, choix de différentes qualités pour chaque application, etc. Ses propriétés fonctionnelles uniques font de la gélatine un des ingrédients importants à savoir dans l'industrie alimentaire, photographique, cosmétique et pharmaceutique (**Schrieber & Gareis, 2007**).

La dénaturation d'une protéine consiste à rompre ces interactions sans briser les liaisons peptidiques. Ces molécules « dépliées » vont dans certaines conditions s'agréger et former un gel. La gélatine est le produit de dénaturation du collagène, protéine que nous allons décrire à présent.

La gélatine alimentaire a une longue histoire. Dans les temps anciens, elle était utilisée comme une « colle biologique », et au cours du temps, son industrialisation, a amené à l'utiliser dans de nombreuses applications.

La production de la gélatine a eu lieu aux Etats-Unis vers 1850 (fabrication de desserts sous forme de gelées et de capsules à usage pharmaceutique) et après 1878 (premières émulsions

photographiques), puis vers 1930 en Europe, quand la source des peaux de porcs fraîches est venue s'ajouter aux matières premières traditionnelles. Depuis lors, la production de gélatine est destinée à de multiples usages. Néanmoins trois secteurs se distinguent dans l'utilisation de celle-ci: les industries alimentaire, pharmaceutique et photographique (**Shrieber et Gareis, 2007**).

À nos jours la gélatine est devenue un produit de consommation très utilisé. Elle trouve sa place tout aussi bien dans les industries non alimentaires qu'alimentaires. De plus, par sa nature protéique spécifique, elle peut être ajoutée aux préparations alimentaires sans être considérée comme un additif ce qui explique son utilisation si répandue. L'intérêt de la gélatine ne sera pas seulement limité aux applications classiques. De nouvelles utilisations dans les soins médicaux et dans les domaines techniques spécialisés se distingueront par l'utilisation de gélatine et d'hydrolysats de gélatine (**Schrieber et Gareis, 2007**).

- **Procédé de fabrication de la gélatine**

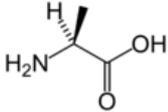
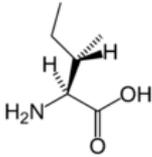
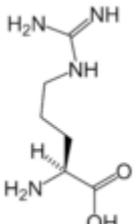
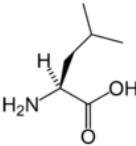
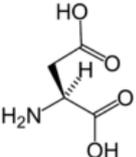
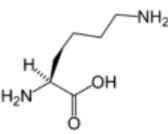
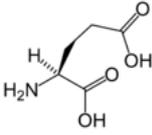
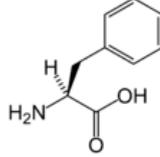
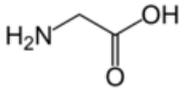
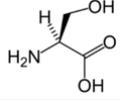
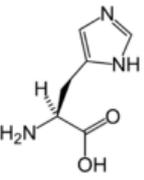
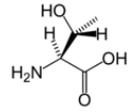
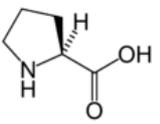
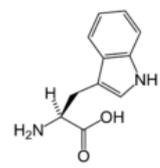
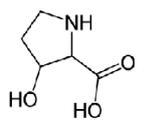
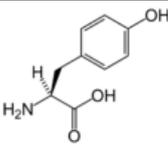
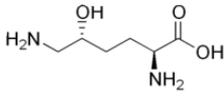
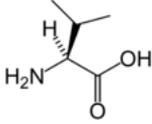
La conversion du collagène en gélatine a été longuement étudiée (**Harding, 1965; Veis, 1964; Ward et Courts, 1977**). Elle se réalise en deux étapes: la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière est le résultat de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statistique (**Jones, 1987**).

La fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physico-chimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, le point isoélectrique (pIE) etc.

- **Structure**

La gélatine contient un total de 18 acides aminés en différentes concentrations. La liaison de ces acides aminés forme des chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne contient environ mille acides aminés. La structure globale de la gélatine est une molécule en forme de baguette se composant des structures hélicoïdales primaire, secondaire et tertiaire (**Tableau I.1**) (**Karim et Bhat, 2008**).

Tableau I.1: Différentes fractions en acides aminés entrant dans la composition de la gélatine (Karim et Bhat, 2008).

Teneur en acides aminés exprimée en grammes pour 100g de gélatine pure.		structures	Teneur en acides aminés exprimée en grammes pour 100g de gélatine pure.		structures
Alanine	11,3		Isoleucine	1,6	
Arginine	9,0		Leucine	3,5	
Acide aspartique	6,7		Lysine	4,4	
Acide glutamique	11,6		Phénylalanine	2,5	
Glycine	27,2		Serine	3,7	
Histidine	0,7		Thréonine	2,4	
Proline	15,2		Tryptophane	0,0	
Hydroxyproline	13,3		Tyrosine	0,2	
Hydroxylysine	0,8		Valine	2,8	

- **Tests de contrôle qualité du produit fini**

Les tests qui servent à vérifier les paramètres technologiques du produit fini sont décrits ci-dessous.

- ✓ **La force en gel (Bloom)**

La force en gel, ou Bloom, exprimée en gramme, est liée à l'élasticité mécanique du gel de gélatine. Elle permet la classification des gélatines. La mesure standardisée consiste à déterminer la force maximale mesurée lors de la pénétration d'un cylindre standardisé de ½ pouce de diamètre à une profondeur de 4mm et avec une vitesse de 1mm/seconde dans un gel à 6,67% mûré pendant 18 heures à 10°C dans un flacon spécifique (Rbii, 2010). Quelques exemples d'applications industrielles, selon les blooms, sont donnés dans le (Tableau I.2).

Tableau I.2: Exemples de Blooms par application (Rbii, 2010).

Applications	Bloom (g)
Guimauves	75-125
Nougats	100-150
Desserts/laitiers industriels	150-250
Capsules molles	120-200
Capsules dures	150-280
Photographie	200-300

- ✓ **La viscosité**

La mesure de la viscosité fait partie des paramètres « clé » de la gélatine, ce résultat est souvent de première importance. Elle dépend de trois paramètres: la concentration, la température et le pH. On la détermine à l'aide d'un viscosimètre capillaire. Elle est déterminée en mesurant le temps d'écoulement de 100 ml d'une solution à 6.67% de gélatine dans l'eau à 60°C. Les viscosités des solutions varient suivant l'extraction et l'origine de la gélatine (Rbii, 2010).

- ✓ **Le pH et le point isoélectrique (pIE)**

La mesure standardisée s'effectue sur des solutions à 6.67%. Toutes les solutions de gélatine ont un pH qui varie en fonction du traitement subi par les matières premières et qui est compris entre pH 4 et pH 6.5, donc légèrement acide.

La gélatine est un exemple de polymère amphotère, présentant des propriétés cationiques en milieu acide et des propriétés anioniques dans un environnement alcalin. Elle se caractérise donc par le point isoélectrique (pIE) qui joue sur son aptitude au mélange avec d'autres hydrocolloïdes, c'est à dire par le pH auquel elle est globalement neutre (autant de charges positives que négatives) (Karim et Bhat, 2008). A cette valeur de point isoélectrique, on a l'équilibre suivant (Figure I.5):

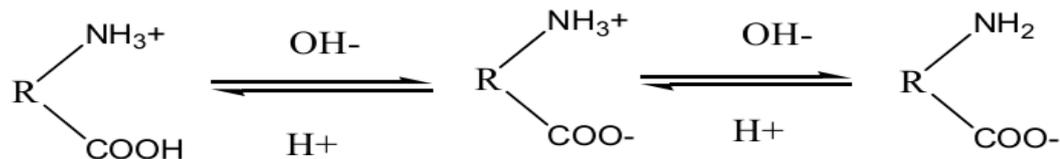


Figure I.5: Equilibre de charges au point isoélectrique (Merveille, 2011).

On constate que les gélatines de type A se distinguent du type B par:

- Leur point isoélectrique (toujours supérieur à 6,5 pour le type A et voisin de 5 pour le type B),
- Une viscosité plus faible pour un même degré Bloom (Chene, 2002). Le **tableau I.3** représente les caractéristiques de quatre types de gélatine.

Tableau I.3: Caractéristiques des gélatines (Chene, 2002).

Type	A		B	
Origine	Couennes de porc	Os	Os	Peaux de bovins
pI	7,5-9	6,5-8	4,8-5,2	4,8-5,2
Bloom (g)	60-300	60-300	60-280	60-260
Viscosité (m Pa.s)	1,8-5,5	1,8-4	2-7	2-7

- **Gélatine en solution**

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Pour que la gélatine soit solubilisée, il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C.

Pour des températures supérieures à 40°C, la gélatine présente une structure dite désordonnée, dans laquelle on retrouve en solution, un mélange de différentes fractions α , β , γ

en conformation de pelotes statiques. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine, on dira également que la gélatine est à l'état sol (**Bigi et al., 2004**).

Si l'on refroidit une solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place. Il s'agit là d'une des principales raisons de l'utilisation de la gélatine par les industriels.

La gélification traduit une transition conformationnelle, c'est-à-dire le passage de l'état désordonné (pelote statistique) à l'état ordonné (hélice gauche). Il peut être suivi par la mesure du pouvoir rotatoire qui détecte l'apparition ou la disparition des hélices gauches.

Le phénomène de gélification se traduit par une renaturation partielle des triples hélices de collagène, dépendant de la concentration initiale en gélatine et de la vitesse de refroidissement. Pour de très faibles concentrations ($C \sim 0,01\%$ en poids), la transition pelote-hélice se fait par repliement de la chaîne sur elle-même due à une prédominance de liaisons intramoléculaires. A des concentrations supérieures à $0,1\%$, la transition implique une agrégation des chaînes par formation de triples hélices interchaînes (**Djabourov et al., 1985**).

Concernant la température, plus les solutions sont refroidies brutalement, plus le pourcentage de boucles et de repliement des chaînes serait important (**Harrington et Rao, 1970**).

Le changement de conformation observé dans les solutions de gélatine lui confère des propriétés de surface bien spécifiques qui sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés et que certaines parties des séquences aminées de la molécule, contiennent des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les deux parties hydrophile et hydrophobe ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse.

Dans le même temps, la gélatine a plusieurs propriétés qui protègent et stabilisent la surface formée. Cette propriété multifonctionnelle de la gélatine est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions.

La gélatine forme des solutions colloïdales avec l'eau, solution dans laquelle le solvant est un liquide et le soluté un solide dispersé de manière homogène sous forme de très fines particules, la préparation étant soit un sol, soit un gel. Elle est donc un « hydrocolloïde ». Ces derniers sont souvent utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs fonctionnalités (**Meyer et al., 2000**).

- **Applications**

La gélatine possède des qualités particulières recherchées par l'industrie pour obtenir des textures spécifiques. La propriété «gélifiante» de la gélatine est la plus connue et la plus

utilisée. Le marché de la gélatine se caractérise par l'existence de trois segments essentiels: alimentaire, photographique et pharmaceutique.

✓ **Industries alimentaire et photographique**

Dans la production alimentaire moderne, la principale propriété utilisée est sa capacité unique à réagir à la chaleur: la gélatine fond à 37°C, la température du corps, puis redevient ferme en refroidissant. Sa texture agréable et son fondant en bouche en font un ingrédient irremplaçable. De nombreux produits allégés ou pauvres en matières grasses n'existeraient pas sans la gélatine. Elle est ainsi par exemple présente dans la margarine ou le beurre allégé, les pâtes à tartiner ou les fromages à taux réduit en matières grasses. La gélatine est sans goût, lie de grandes quantités d'eau, forme des gels et procure une agréable sensation en bouche. La gélatine alimentaire est indispensable dans de nombreuses confiseries, telles que les bonbons gélifiés (oursons, gommes), les caramels mous, les guimauves et les marshmallows, les meringues, les réglisses, etc. Elle leur confère une grande élasticité, une consistance optimale pour la mastication et améliore leur durée de conservation. Sa capacité à fondre à la température du corps en fait un substitut indispensable aux matières grasses dans les aliments allégés.

Les produits photographiques à base de sels d'argent sont constitués de plusieurs couches de gélatine (jusqu'à 15) qui sont coulées sur film ou sur papier. La gélatine est utilisée comme liant pour les sels d'argent hautement photosensibles. Son pouvoir gonflant permet aux produits de développement de pénétrer dans les couches sensibles et d'en être éliminés par lavage. La gélatine constitue un élément important dans le procédé complexe de la technique des couches. Elle présente la particularité de pouvoir se solubiliser à chaud et de former un gel en refroidissant, gel que l'élimination de l'eau permet de rendre permanent (**Meyer et al., 2000**).

✓ **Industrie pharmaceutique**

Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est utilisée pour la fabrication des gélules et des capsules. Elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène. Les gélules sont essentiellement employées pour les médicaments liquides, alors que les capsules sont utilisées pour les poudres. La gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même influencer sur la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accéléralant, soit en la ralentissant (effet « retard »). Les comprimés enrobés de gélatine représentent un

nouveau progrès technologique, l'enrobage de gélatine facilitant l'ingestion du comprimé par les patients (Meyer *et al.*, 2000).

I-3. Comportement des mélanges de biopolymères

Les mélanges de biopolymères en solution aqueuse présentent soit une instabilité thermodynamique se traduisant macroscopiquement par une séparation de phase, soit, dans des cas plus rares, par une miscibilité des biopolymères dans des solutions diluées (interactions biopolymère-biopolymère égale à celles biopolymère-solvant et solvant-solvant) (Albertsson, 1971; Tolstoguzov, 2003; Turgeon *et al.*, 2007). La compatibilité ou l'incompatibilité entre les biopolymères proviennent de la faible entropie de mélange des composés macromoléculaires, qui ne peut compenser des valeurs même très faiblement positives de l'enthalpie de mélange, défavorables à la stabilité de ce dernier (Frugier, 1994).

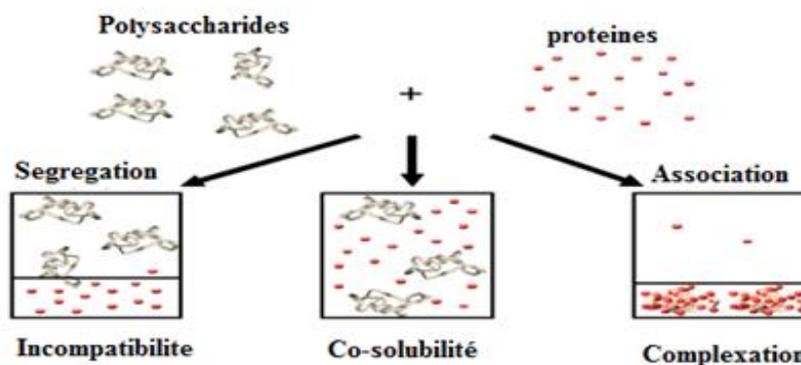


Figure I.6: Comportement des protéines-polysaccharides (De Kruif Tuinier, 2001).

Lorsque la concentration des biopolymères augmente et dépasse une certaine valeur critique, la co-solubilité devient limitée entre les deux biopolymères et conduit à une séparation de phase (Tolstoguzov, 2003; Turgeon *et al.*, 2007). La séparation de phase peut être soit de type ségrégatif soit de type associatif (Figure I.6). L'interaction protéines-polysaccharides peut changer de répulsive à attractive et vice versa, suivant les conditions du solvant (pH, force ionique...), de concentrations ou de température (Dickinson, 1993; Bergfeldt *et al.*, 1996).

I-4. Approche thermodynamique

La première loi de la thermodynamique démontre que l'énergie d'un système est conservée sous une forme ou une autre et ce peu importe les réactions impliquées. La deuxième loi de la thermodynamique exprime la tendance d'un système vers une augmentation d'entropie. L'énergie libre de Gibbs (G) est une équation d'état qui met en relation les deux premières lois de la thermodynamique lorsqu'une réaction se produit à température et pression constantes équation (1). Lorsque la température et le volume d'un système ont des valeurs constantes, l'énergie de Gibbs peut être remplacée par l'énergie libre de Helmholtz (A) calculée par l'équation (2).

$$G = H - TS \quad (1)$$

$$A = U - TS \quad (2)$$

Où **H** : enthalpie (J)
S : entropie ($J \cdot K^{-1}$)
U : énergie interne (J)
T : température (K)

Les énergies libres de Gibbs et de Helmholtz permettent de connaître la spontanéité d'une réaction. Une réaction est spontanée lorsque le ΔG ou le ΔA est de signe négatif alors qu'elle est défavorisée lorsque le ΔG ou le ΔA est positif. Lorsque le ΔG ou le ΔA est nul, la réaction en cours est à l'équilibre. L'équation d'état de l'énergie de Gibbs (1) démontre qu'une réaction est favorisée lorsque la différence d'entropie (ΔS) est positive et/ou lorsque la différence d'enthalpie (ΔH) est négative. L'énergie libre de Gibbs est la propriété thermodynamique la plus utilisée lors de l'étude de la stabilité de solutions composées de solvants et de solutés de nature alimentaire (Semenova et Dickinson, 2010).

1-5. Incompatibilité et comptabilité thermodynamique

1-5-1. Cas particuliers des interactions protéine/polysaccharide

Les paramètres d'interaction χ de la théorie de **Flory-Huggins (Flory, 1942; Huggins, 1942)**, permettent de connaître la nature attractive ou répulsive entre deux polymères. Le rapport entre l'enthalpie et l'entropie de mélange est grandement influencé par la concentration en polymère et détermine s'il y aura une séparation de phases.

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide anionique sont dans une même solution, trois types de comportement peuvent être observés:

Premièrement, les deux polymères peuvent être en deux phases distinctes sans interagir, où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères. Cet état, appelé **incompatibilité thermodynamique ou séparation de phases ségrégative**, existe lorsque les interactions entre polymères d'une même nature sont favorisées au détriment de celles entre polymères de natures différentes. Cette incompatibilité dépend des charges portées par chaque polymère, du pH, de la flexibilité des chaînes du polysaccharide, du poids moléculaire des polymères, de la concentration en sels ainsi que de la concentration en solides totaux.

Le deuxième cas, qui est occasionnellement observé, se produit lorsque les macromolécules forment un mélange homogène spontané sans interagir, qui est en constante compétition avec celui d'incompatibilité thermodynamique. Plus la différence entre les poids moléculaires des macromolécules augmente, plus le déséquilibre entre les forces attractives et répulsives s'accroît, et plus l'apparition d'une incompatibilité est favorisée entre les deux polymères. Uniquement quelques exemples de co-solubilité ont été illustrés dans la littérature, dont le cas de l'albumine de sérum bovin (BSA) et de la pectine (**Semenova *et al.*, 1991**).

Troisièmement et dernièrement, il peut y avoir présence de deux phases où les polymères de charges opposées se retrouvent principalement dans la même phase. Cette **compatibilité thermodynamique, ou séparation de phases associative**, est caractérisée par la formation d'un complexe protéine/polysaccharide, aussi appelé coacervat (coacervation). Les interactions électrostatiques mises en évidence entre polysaccharides et protéines ont fait l'objet de plusieurs études pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de ces complexes et leurs applications possibles dans différents domaines (**Hill et Zadow, 1974; Ledward, 1979; Tolstoguzov, 1986; Schmitt, 2000**). Les modèles de **Overbeek-Voorn (Overbeek-Voorn, 1957) et de Veis-Aranyi (de Veis-Aranyi, 1960)** sont les deux théories majeures décrivant le phénomène de compatibilité thermodynamique. Elles sont bien résumées et détaillées dans les ouvrages de **Burgess (Burgess, 1990) et de Schmitt *et al.*, (Schmitt *et al.*, 1998)**.

1-6. Modèles théoriques développés sur la complexation

La coacervation complexe a été pour la première fois appréhendée par **Bugenberg de Jong (Bugenberg de Jong, 1936)**. Ces travaux décrivent la formation d'une phase concentrée lors du mélange de gélatine et de gomme d'acacia en milieux aqueux. Le nom de coacervation complexe a alors été donné pour caractériser ce phénomène, coacervation venant d'*acervus*, mot latin signifiant « lié ». Lors de ces travaux, il a observé la formation de gouttelettes liquides de forme sphérique, baptisées coacervats. Ensuite, les travaux sur la coacervation se sont développés surtout à partir des années 60. Par la suite d'autres applications de ces complexes sont apparues (**Milanovi et al., 2014; Karimia et al., 2013**), la synthèse de biomatériaux (**Taravel et Domard, 1994**), les biofilms (**Yan et al., 2005**).

Différents modèles théoriques ont été proposés afin de mieux comprendre la complexation et la séparation de phase qu'elle peut induire. Plusieurs théories ont été développées. La théorie de **Overbeek-Voorn (Overbeek-Voorn, 1957)**, est fondée sur les interactions entre la gomme arabe et la gélatine en solution. D'après cette théorie, le phénomène de complexation est spontané, résultant d'un équilibre entre des interactions électrostatiques attractives et une entropie favorisant l'éloignement des molécules. La formation d'un complexe permet d'encager des molécules d'eau et ainsi d'augmenter le nombre de configurations possibles dans le complexe. La validité de cette théorie repose sur plusieurs présomptions: les interactions solvant-soluté sont négligeables, la distribution des charges est uniforme dans la solution, les interactions entre les polymères sont non spécifiques et les chaînes des polymères doivent adopter une structure enroulée au hasard. La théorie de **Nakajima-Sato (Nakajima-Sato, 1972)** reprend la théorie de **Overbeek-Voorn (Overbeek-Voorn, 1957)** en introduisant un terme d'interaction de Huggins.

La théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)** est basée sur l'étude d'une solution contenant deux gélatines portant des charges de signes opposés, dont le comportement n'avait pu être décrit d'une manière satisfaisante par la théorie de **Overbeek-Voorn (Overbeek-Voorn, 1957)**. Selon la théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)**, la complexation se produit en deux étapes. La première étape est caractérisée par la formation spontanée d'agrégats intrapolymériques solubles qui sont composés de macromolécules interagissant avec une ou plusieurs molécules d'un ligand de taille inférieure. Ces agrégats moléculaires occupent un volume identique à celui occupé par la macromolécule. La complexation proprement dite survient lors d'une deuxième étape qui peut durer jusqu'à quelques jours. Cette étape est favorisée par un gain d'entropie lors de la dilution de la phase contenant les

agrégats solubles, qui se réorganisent d'une manière aléatoire dans une phase concentrée en complexes interpolymériques insolubles. La théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)** prend compte des interactions soluté-solvant en incluant le paramètre χ_{12} de **Flory-Huggins (Flory, 1942; Huggins, 1942)**.

La théorie de **Tainaka (Tainaka, 1979)** a été développée sur les bases de la théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)**. Elle est plus générale puisqu'elle n'est pas limitée aux systèmes à faible densité de charges. Le paramètre de Flory-Huggins (**Flory, 1942; Huggins, 1942**), qui est utilisé pour la phase diluée dans la théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)**, est maintenant aussi appliqué à la phase concentrée. Contrairement à la théorie de **Veis-Aranyi (Veis-Aranyi, 1960)**, les interactions impliquées lors de la formation des agrégats solubles sont non spécifiques. Selon **Tainaka (Tainaka, 1979)**, la force principale conduisant à la séparation de phases est de nature électrostatique attractive.

I-7. Mode de préparation en solution des complexes polyélectrolytes

Le mode de préparation a été étudié afin de comprendre son influence sur les complexes obtenus. Une méthode, dite des « ajouts successifs » est appliquée notamment pendant les titrations. Une solution de polyélectrolyte, à une concentration donnée, est alors ajoutée par goutte à goutte à la solution contenant le polyélectrolyte opposé. **Dautzenberg et Jaeger (Dautzenberg et Jaeger, 2002)** ont montré que l'ordre d'introduction des polyélectrolytes peut avoir une influence. Les polyélectrolytes obtenus n'ont alors pas les mêmes masses molaires si le polycation (PC) est ajouté au sein du polyanion (PA) ou si c'est l'inverse (**Dautzenberg, 2000**).

La complexation se fait de manière coopérative, ce modèle est communément appelé « ladder », ou théorie de l'échelle. La complexation s'effectue alors de manière ordonnée, mais malheureusement cette méthode est difficilement reproductible (**Philipp et al., 1989**).

L'autre méthode de complexation consiste à ajouter le PA dans le PC en une fois, méthode appelée « one shot » ou de manière très rapide par titration. La complexation est alors désordonnée, elle est appelée « scrambled egg », oeuf brouillé. Ce modèle a été décrit par **Michaels et Miekka (Michaels et Miekka, 1961)**. Ces deux modèles sont représentés schématiquement sur la **Figure I-7**.

Les polyélectrolytes obtenus par cette méthode sont plus stables dans le temps et sont donc plus adaptés aux applications (**Dragan et al., 2006**).

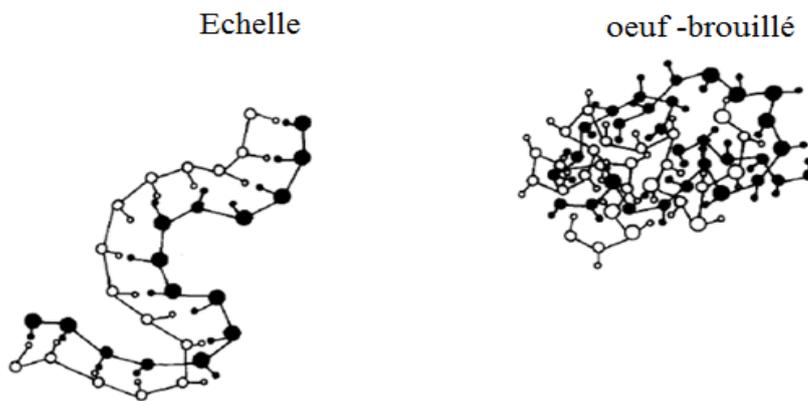


Figure I.7: Modèles de structure des polyelectrolytes: Echelle « ladder », œuf-brouillé « scrambled egg » (Philipp *et al.*, 1989).

I-8. Nature des interactions entre les constituants d'un complexe

Selon Tolstoguzov (Tolstoguzov, 1997), les interactions macromoléculaires responsables de la formation des complexes peuvent être regroupées en trois classes distinctes: **i)** les interactions entre les molécules chargées, **ii)** les interactions entre les résidus acides ou basiques des chaînes latérales des macromolécules et **iii)** les interactions entre les autres chaînes latérales des macromolécules. Ces interactions peuvent être réparties également en fonction de leur intensité, de leur spécificité et de leur nature, attractive ou répulsive.

I-8-1. Interactions électrostatiques

La formation initiale de complexes macromoléculaires par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques est considérée comme une étape primordiale de la coacervation complexe. Les interactions électrostatiques s'établissent entre des molécules portant des charges électriques opposés. Les charges peuvent avoir plusieurs origines:

- Ionisation ou dissociation de groupes en surface.
- Adsorption non équilibrée d'ions conduisant à des excès superficiels positifs ou négatifs.

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle dipôle. L'énergie potentielle (V) de ces interactions dépend des charges portées par les molécules (Q_1

et, de la distance entre les molécules (d) et de la constante diélectrique du milieu (ϵ) (**Figure I.8**).

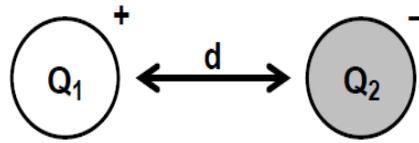


Figure I.8: Illustration de l'interaction électrostatique entre deux charges Q_1 et Q_2 .

L'énergie potentielle est exprimée selon l'équation (3) :

$$V = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 d} \quad (3)$$

ϵ_0 : La permittivité du vide : $8,854187 \times 10^{-12}$ A.s.V⁻¹.m⁻¹ (ampères-seconde par volt par mètre).

ϵ : La permittivité du milieu.

d: La distance entre les deux charges.

La complexation électrostatique entre protéines et polysaccharides a lieu dans l'intervalle de pH compris entre le point isoélectrique de la protéine et la valeur pK des groupements anioniques du polysaccharide, principalement carboxyles (pK ~ 3) à de faibles forces ioniques. Dans cet intervalle de pH, les deux biopolymères portent des charges opposées. D'après **Ledward (1994)**, la force de complexation entre protéines et polysaccharides dépend de la distribution des groupes ionisables à la surface de la protéine, de la facilité avec laquelle la structure native de la protéine se déplie, et la flexibilité de structure et de distribution de charge sur le polysaccharide.

Il est signalé que deux types de complexes macromoléculaires peuvent être obtenus lors de la mise en jeu d'interactions électrostatiques. Des complexes solubles peuvent se former lorsque le nombre de charges entre les molécules qui interagissent n'arrivent pas à s'équilibrer entièrement. La charge globale portée dans ce cas par le complexe obtenu, lui permet de rester soluble tout en interagissant avec les molécules de solvant. En second lieu, on a formation de complexes insolubles lorsque la neutralisation des charges portées par les deux

macromolécules est totale, la charge globale du complexe obtenu étant nulle. Ces complexes insolubles forment une phase concentrée liquide ou comme un gel, contenant les deux biopolymères ayant interagi (**Tolstoguzov, 1996**).

La neutralisation mutuelle des chaînes portant des charges opposées diminue l'hydrophobicité des zones de jonction formées par la diminution de la charge nette. Le complexe possède alors une conformation compacte avec des zones de jonction cachées dans la partie interne hydrophobe du complexe (**Tolstoguzov, 2003**). Plusieurs théories concernant l'interaction électrostatique entre des macromolécules chargées ont d'ailleurs été développées (**Ghorbani et al., 2014; Yang et al., 2012; Liu et al., 2011; Netz et Joanny, 1998, 1999; Kong et Muthukumar, 1998; Pogodina et Tsvetkov, 1997; Borue et Erukhimovich, 1990**). Celles-ci ne sont pas spécifiques à la coacervation complexe mais, elles servent souvent de base à la description et à l'analyse des résultats concernant les phases précoces du phénomène dans les mélanges macromoléculaires (**Wen et Dubin, 1997**).

Parmi les premières études ayant mis en considération l'implication de liaisons électrostatiques dans la formation de complexes protéine-polysaccharide est celle établie par **Tiebackx (Tiebackx, 1911)**.

I-8-2. Interactions non-électrostatiques

Le rôle des interactions électrostatiques dans la formation des complexes protéines-polysaccharides a été largement étudié. Cependant, aucune étude spécifique sur l'importance des interactions de plus faible énergie, plus précisément les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobe, n'a pu être rencontrée dans la littérature.

Dans la majorité des cas étudiés, les interactions électrostatiques entre des protéines et des polysaccharides chargés de manière opposée prévalent lors de la formation des complexes macromoléculaires. Cependant, il existe des systèmes pour lesquels les interactions initiales entre les biopolymères peuvent être considérés comme étant des interactions hydrogènes ou des interactions hydrophobes non-électrostatiques (**Tribet et al., 1998 ; Sedlák et Antalík, 1998**).

D'autre part, dans certains mélanges, les complexes électrostatiques primaires peuvent être stabilisés par des interactions non-électrostatiques qui deviennent alors des interactions secondaires (**Sanchez et Paquin, 1997**). D'une manière générale, ces interactions peuvent s'établir à condition que les biopolymères sont suffisamment proches les uns des autres au sein du complexe électrostatique et que des groupements réactifs interagissent, c'est à dire peuvent entrer en contact (**Tolstoguzov, 1993**).

I-8-3. Liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes ou ponts hydrogènes sont des liaisons non covalentes, de type dipôle-dipôle. Elles ont un caractère ionique et font référence à une interaction entre un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (N, O ou S) et un autre atome électronégatif. De plus, les liaisons hydrogènes sont plus spécifiques que les interactions de Van der Waals car elles requièrent la présence de groupements donneurs et accepteurs d'atomes d'hydrogène supplémentaires. L'établissement de liaisons hydrogène est favorisé à basse température et l'énergie d'une liaison s'échelonne entre 10 et 30 kJ.mole⁻¹. De telles interactions ont été mises en évidence dans le cadre de la formation de complexes entre la gélatine et la pectine (**Braudo et Antonov, 1993**).

I-8-4. Interactions hydrophobes

L'effet hydrophobe n'est pas une liaison mais un facteur thermodynamique qui favorise les interactions macromoléculaires (**Pollard et Earnshaw, 2004**). Les interactions hydrophobes sont en fait des forces indirectes qui favorisent le regroupement de molécules non polaires suite à des interactions entre des molécules polaires.

Les interactions hydrophobes, au même titre que les liaisons hydrogènes, sont susceptibles de s'établir dans les complexes protéine-polysaccharide. Ces interactions sont de nature endothermique et sont donc favorisées par une augmentation de la température. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 kJ.mole⁻¹.

Les interactions hydrophobes sont indispensables dans le traitement thermique de stabilisation des complexes électrostatiques (**Sanchez et Paquin, 1997**), comme c'est par exemple le cas dans le système composé de protéines de lactosérum et de la gomme xanthane (**Chen et al., 1989**).

I-8-5. Les liaisons covalentes

Le lien covalent est permanent et spécifique. Il implique le partage d'électrons entre deux ou plusieurs atomes. Le lien covalent est court, entre 0,1 et 0,2 nm, et son énergie potentielle se situe entre 200 et 800 kJ.mol⁻¹ (**Israelachvili, 1992**).

Généralement, ce type de liaison est obtenu par réaction chimique des groupements aminés des protéines avec les groupes carboxyliques des polysaccharides pour former une liaison de type amide. Cette réaction peut être favorisée par exemple par l'utilisation d'agents réticulant (glutaraldéhyde, carbodiimide) que l'on évitera d'utiliser dans le cas d'une application alimentaire à cause de leur toxicité.

I-9. Principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation de complexes protéines-polysaccharides

La complexation étant principalement suivie par des interactions électrostatiques entre les biopolymères lors de la formation des complexes macromoléculaires primaires, les paramètres physico-chimiques influençant ces interactions ont un effet important sur la séparation de phase. Dans un premier temps, nous distinguerons des paramètres que nous qualifierons de physico-chimiques comme le pH, la force ionique, le ratio massique des macromolécules, la masse moléculaire des macromolécules, la densité de charge des macromolécules, et la concentration totale en biopolymères (**Wen et Dubin, 1997**).

Dans un second temps, nous décrirons d'autres paramètres, de nature physiques, car ils mettent en jeu un ensemble de forces pouvant influencer la structure et la stabilité des complexes et coacervats. Il s'agit de la température, la pression, l'agitation et le temps d'agitation. Ces paramètres externes peuvent être attribués aux différents traitements technologiques industriels appliqués aux mélanges protéine-polysaccharide, dans l'industrie alimentaire par exemple.

I-9-1. Influence du pH

Le pH joue un rôle très important dans le processus de formation de complexes entre les protéines et les polysaccharides. En effet, le pH est responsable de l'ionisation des macromolécules afin que des interactions électrostatiques puissent s'effectuer. Plus précisément, le pH contrôle l'ionisation des groupements des chaînes latérales, des groupements aminés et carboxyliques des protéines et des groupements carboxyliques des polysaccharides (**Schmitt et al., 2000**). Les complexes formés peuvent être solubles ou insolubles dépendamment du degré de neutralisation des charges opposées (**Versic, 1988**). Des polymères fortement chargés, résultant de la variation du pH, auront une conformation modifiée qui les amènera à former des agrégats insolubles au détriment de la formation de complexes solubles (**Burgess, 1990**). En fait, pendant la formation de complexes entre protéine et polysaccharide anionique, la charge nette (négative) des molécules de polysaccharides diminue progressivement, avec la baisse du pH, pendant qu'elles s'attachent aux molécules de protéine chargées positivement (**Benichou et al., 2002**). La conséquence directe qui en découle est la diminution de la solubilité et de l'hygroscopicité de ces polymères et finalement la formation de complexes.

L'influence du pH sur la formation des complexes électrostatiques entre les macromolécules en solution aqueuse a été mise en évidence dès le début du siècle par **Tiebackx (Tiebackx, 1911)** qui a pu démontrer macroscopiquement que la précipitation d'un mélange composé de

gélatine (0,5% p/p) et de gomme d'acacia (2% p/p) était dépendante de la quantité et de la normalité de l'acide ajouté afin d'ajuster le pH.

Le maximum d'interactions apparaît à un point appelé point d'équivalence électrique (PEE) où la protéine et le polysaccharide possèdent des charges également opposées (**Singh et Burgess, 1989**). En prenant comme exemple le système β -lactoglobuline/ gomme d'Acacia, il a été montré que l' PEE se situait autour d'une valeur de pH de 4,2 (**Schmitt et al., 1999**). Le rendement maximum de coacervats est obtenu pour un ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps) spécifique. À un pH et une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps conditionne la neutralisation des charges entre les deux macromolécules (**Burgess, 1994 ; Xia et Dubin, 1994**).

L'influence du pH est telle que des variations de l'ordre de 0,5 unités pH sont suffisantes pour que la formation de complexes soit réduite de manière significative (**Schmitt et al., 1999**). Deux valeurs de pH, pH_c et pH₀, ont été identifiées et correspondent à des changements structuraux et morphologiques (**Mattison et al., 1999 ; Kaibara et al., 2000b ; Mekhloufi et al., 2005**). Déterminé par une légère augmentation de la l'intensité lumineuse diffusée dans la dispersion, le pH critique, pH_c, correspond à la complexation primaire des macromolécules et la formation de complexes intrapolymériques (**Figure 1-9**). Le pH₀ fait référence à une séparation de phase à l'échelle microscopique, conduisant à la formation de gouttelettes coacervées (**Figure 1-9**). Le pH₀, est déterminé par une augmentation significative de la turbidité du système.

Ainsi, la plupart des protéines alimentaires (pIE autour de 5) peuvent former des complexes avec les polysaccharides anioniques puisque les deux polymères porteraient des charges opposées (**Dickinson, 1998**). Cependant la tendance vers une formation de coacervation complexe insoluble est favorisée par de faibles concentrations de sel et par des valeurs de pH en dessous du pIE de la protéine (**Dickinson, 1998**). Des travaux de compatibilité de l'albumine de l'œuf et de différents amidons ont montré qu'un optimum de complexes insolubles était obtenu en variant la quantité d'acide ajoutée (**Schmitt et al., 2000**).

I-9-2. Influence de la force ionique

Parmi les trois types d'équilibre qu'on trouve dans une solution binaire protéine/polysaccharide, la miscibilité est apparante généralement à des forces ioniques plus faibles que l'incompatibilité et la séparation de phases associative (**Dickinson, 2003**). Le nombre d'ions présents dans un mélange de biopolymères est un facteur très important affectant le phénomène de complexation car il intervient dans les composantes entropiques et enthalpiques de l'énergie libre de mélange (**Tolstoguzov, 1997**).

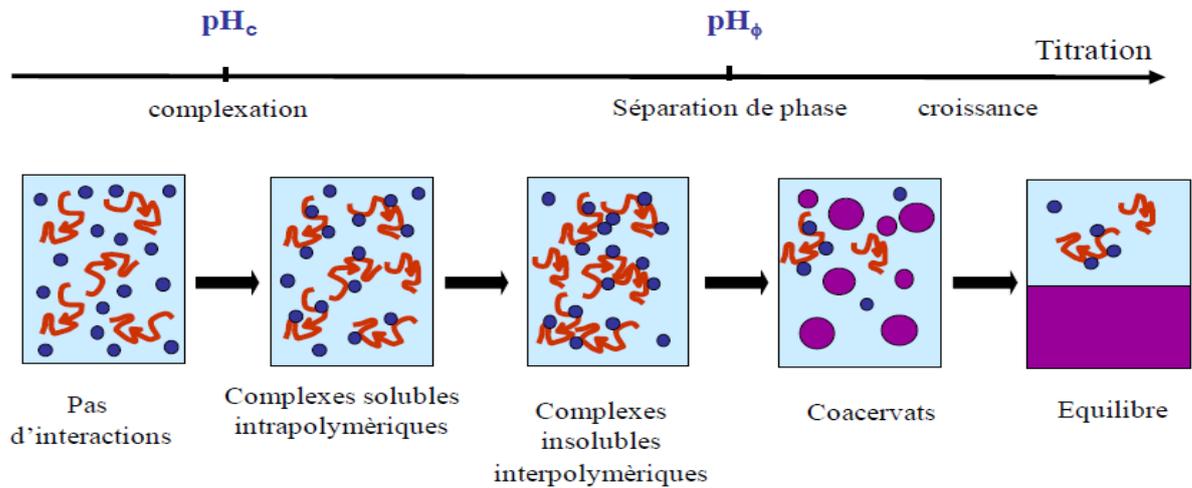


Figure 1.9: Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH. Les cercles bleus représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polysaccharide. pH_c : pH critique, pH_ϕ : pH de séparation de phase (Aberkane *et al.*, 2010).

À faible force ionique, le nombre de charges présentes sur le biopolymère est suffisant pour qu'il y ait des interactions électrostatiques. La libération des contre-ions lors de la complexation entre les macromolécules favorise le gain entropique de mélange et l'énergie libre électrostatique. De fortes concentrations salines produisent un effet inverse, les ions présents entrant alors en compétition avec les macromolécules et l'attraction électrostatique entre les biopolymères est réduite à cause de la diminution de charge nette de ces derniers pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe (Xia et Dubin, 1994). Cet effet est plus prononcé en présence d'électrolytes ou d'ions de valence supérieure à un (Burgess *et al.*, 1991; Tsung et Burgess, 1997). Cet effet spécifique de la force ionique, de même que le type d'ions présents, avait été mis en évidence initialement par Bungenberg de Jong (Bungenberg de Jong, 1936) pour le système gélatine/gomme d'acacia. Ainsi, les ions divalents avaient pour effet de supprimer la coacervation complexe à des forces ioniques inférieures aux ions monovalents, cette suppression pouvant cependant être levée par dilution du mélange.

Des travaux similaires ont été aussi entrepris par Mattison *et al.*, (Mattison *et al.*, 1999) et Schmitt *et al.*, (Schmitt *et al.*, 1999) qui ont montré que les ions divalents supprimaient la coacervation complexe à des concentrations ioniques plus faibles que les ions monovalents, mais que cette suppression pouvait être levée si la solution des ions divalents était diluée. Ceci

démontrerait que l'effet ionique des ions divalents est plus fort que celui des ions monovalents.

Dans un système gélatine-polyélectrolyte, **Bowman *et al.*, (Bowman *et al.*,1997)** ont également mis en évidence une valeur critique de force ionique qui détermine la taille des particules formées. Ces auteurs expliquent la diminution de la taille des complexes à faible et forte force ionique par une solubilisation des complexes macromoléculaires du fait de l'excès de charges présentes dans la dispersion, interprétation reprise par **Wang *et al.*, (Wang *et al.*,1999)** pour expliquer le même phénomène dans un système composé de micelles anioniques et d'un polymère cationique.

Pour conclure, il faudrait rappeler que la force ionique a un effet sur le pH_c et le pH₀. La tendance générale est que pour un ratio protéine : polysaccharide donné, les pH évoluent généralement vers des valeurs plus acides afin de compenser les charges masquées par les ions ajoutés (**Grymonpré *et al.*, 2001**), cela veut dire que la densité de charge des protéines doit être augmentée afin d'atteindre le même niveau de neutralisation de charge entre les protéines et les polysaccharides. Par exemple la valeur du pH₀ diminue de 9 à 7 en ajoutant 200 mM de NaCl dans le système gélatine / τ -carraghénane à un ratio massique protéine : polysaccharide de 1:1 (**Fang *et al.*, 2006**).

I-9-3. Influence de sucres

La présence de sucres tels le lactose, le glucose, le galactose et le sorbitol atténue l'effet d'un traitement thermique en diminuant les interactions entre les protéines. La dénaturation des protéines est cependant favorisée en présence de sucres réducteurs pouvant être impliqués dans la réaction de Maillard (**Morr et Ha, 1993**).

I-9-4. Influence de la densité de charge des macromolécules

La formation de complexes est principalement influencée par un autre facteur qui est la densité des charges qui se localise sur les macromolécules. La densité de charges des biopolymères peut être définie comme le nombre de charges par unité de longueur. De plus, la charge nette des complexes influence la solubilité de ceux-ci dans leur milieu. Par exemple, si un polymère possède un excès de charge par rapport à un deuxième polymère, les complexes formés auront tendance à interagir avec le solvant. Par contre si les charges des deux polymères sont nulles, à ce moment on aura formation de complexes qui seront insolubles. Ces complexes peuvent être à nouveau solubles par titration acide ou par ajout de sels (**Mattison *et al.*, 1995**). Un autre facteur important qui influence la densité de charges des macromolécules, est la conformation des polymères. Une protéine globulaire sera limitée dans

son interaction avec le polysaccharide par rapport à une protéine fibreuse de structure plus désordonnée (gélatine, caséine), qui donne aux sites chargés la possibilité d'interagir avec le polysaccharide (**Mattison et al., 1995**).

Des résultats intéressants ont été obtenus concernant l'influence de la densité de charge des macromolécules sur la formation des complexes entrant dans le cadre de l'étude de la compatibilité entre l'ASB (Albumine de sérum bovin) et le sulfate de l'alcool polyvinylique, un polyélectrolyte anionique dont la densité de charge peut être aisément contrôlée chimiquement (**Park et al., 1992**).

I-9-5. Influence de la masse moléculaire des biopolymères

L'effet de la masse moléculaire des biopolymères sur la séparation de phase d'un système ternaire intervient au niveau du volume occupé par les molécules. Cette séparation de phase est obtenue plus facilement lorsque la masse moléculaire des biopolymères est grande. Toutefois, afin de tenir compte de l'influence de ce paramètre, deux cas limites sont proposés. Si la masse moléculaire des biopolymères est trop faible, l'interaction se fera plutôt par simple pontage ionique plutôt que par formation de complexes électrostatique intermoléculaires. Au contraire, si les masses moléculaires sont trop élevées, l'interaction conduira à la formation de précipités plutôt que de coacervats (**Veis et al., 1967**).

I-9-6. Influence du ratio massique protéine : polysaccharide

Le ratio massique protéine : polysaccharide (Pr : Ps) est un autre facteur influençant la charge nette et les propriétés des complexes obtenus. Il en résulte une influence sur la solubilité des complexes et plus particulièrement sur le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe. En effet, à un pH et à une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules (**Xia et Dubin, 1994**). Si les complexes sont de type stoechiométriques, c'est à dire que la neutralisation est obtenue pour des ratios de 1 : 1, tout ratio supérieur ou inférieur aura pour effet de solubiliser ces complexes et donc de diminuer la formation de coacervats (**Kaibara et al., 2000b**).

Dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la CMC, **Koh et Tucker (Koh et Tucker, 1988a, b)** ont montré que le volume de la phase constituant le coacervat était maximum pour un ratio de mélange de 1 : 1, pour lequel la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est obtenue.

I-9-7. Influence de la concentration totale en biopolymères

La concentration totale en biopolymère est aussi un paramètre important dans le phénomène de complexation. Une concentration totale dépassant un seuil critique peut causer la suppression de la coacervation. Le système n'évolue plus vers une séparation de phase associative mais ségrégative (**Tolstoguzov, 1986**).

En étudiant différents systèmes ternaires protéine/polysaccharide/eau, **Tolstoguzov (Tolstoguzov, 1986)** démontra qu'il n'était pas possible de former des coacervats à des concentrations totales supérieures à 4 % (p / p). Il devient thermodynamiquement inutile de former une phase concentrée en biopolymères si cette concentration est déjà obtenue avant séparation de phase. Cette valeur devrait sans doute être réévaluée en fonction des conditions physicochimiques du système.

I-10. Influence des paramètres physiques sur la formation de complexes protéines-polysaccharides

Nous venons de décrire les principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation des complexes macromoléculaires entre les biopolymères. D'autres paramètres, que nous désignerons de physiques, peuvent également contrôler la formation des complexes en agissant soit directement sur les macromolécules, soit sur les complexes. Ces principaux paramètres sont la température et la pression. Nous décrirons par la suite d'autres paramètres, tel que l'agitation ou le temps d'agitation.

I-10-1. Température

La température influence les interactions non coulombiennes. À titre d'exemple, les liaisons hydrogène sont favorisées par une diminution de la température alors que les interactions hydrophobes et liaisons covalentes sont favorisées par l'augmentation de la température. La séparation de phases associative dans un système protéine/polysaccharide est donc favorisée par une diminution de la température permettant l'établissement de liaisons hydrogène. L'augmentation de la température peut aussi être indirectement bénéfique à la séparation de phases associative (**Schmitt *et al.*, 1998**) dûe à l'exposition de sites réactifs lors de la dénaturation des protéines ou au changement de conformation du polysaccharide. Ces changements peuvent favoriser les interactions électrostatiques associatives entre protéines et polysaccharides. L'effet de la température (25 à 90°C) sur la formation de complexes sérum albumine bovine-alginate à pH 6.8 (**Harding *et al.*, 1993**) a montré une formation de complexes à 25°C alors qu'il n'y a pas de formation de complexes entre 35 et 70°C.

Cependant quand le mélange sérum albumine bovine-alginate est chauffé au dessus de 70°C la formation de complexes a lieu.

Il est aussi à noter que certains polysaccharides comme la gomme xanthane ou les carraghénanes subissent également de telles modifications structurales qui peuvent les faire passer dans des états plus ou moins ordonnés (**Bourriot, 1999; Zuñiga de López, 1999; Langendorff et al., 2000**). Comme nous l'avons évoqué lors de la description des différents types d'interactions rencontrés dans les complexes macromoléculaires, un traitement thermique des mélanges macromoléculaires après complexation peut, dans certains cas, permettre de stabiliser les complexes obtenus par création de nouvelles zones de liaison (**Sanchez et Paquin, 1997**).

I-10-2. Pression

Une technique qui attire l'attention ces dernières années, est l'utilisation de la haute pression (**Dickinson et Pawlowski1, 1996**). Dans le domaine alimentaire, deux types de pression peuvent être appliqués aux polymères en solution (**Ledward, 1994**). Il s'agit des traitements de haute pression hydrostatique et de la microfluidisation qui se fait dans une chambre de microfluidisation. Cette dernière consisterait en une combinaison de turbulence, de cavité gazeuse et de phénomène de cisaillement. L'effet de la haute pression hydrostatique (400-700MPa) sur une solution de β -lactoglobuline (**Dickinson et Pawlowski1, 1996**), avant son émulsion avec une phase lipidique et avant l'ajout de polysaccharide (dextrane), s'exprimerait par une dénaturation (pas aussi prononcée qu'avec de la chaleur) de la protéine à la surface des gouttelettes. L'effet bénéfique des complexes avec les hautes pressions et températures serait dû à la protection par blocage des sites hydrophobes de la protéine par la molécule volumineuse de polysaccharide (**Dickinson, 1998**).

I-10-3. Agitation et temps d'agitation

L'effet de l'agitation ou de la vitesse d'agitation sur la formation de complexes macromoléculaires et de coacervats ont été mis en évidence dans plusieurs études, qui ont donné lieu à des résultats pour le moins contradictoires. Par exemple, dans le cas de la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia dans le but de produire des microcapsules à des fins pharmaceutiques, **Tirkkonen et al., (Tirkkonen et al.,1994)** ont montré que le diamètre moyen des coacervats obtenus était inversement proportionnel à la vitesse d'agitation, à savoir 2,2 μm de diamètre à 420 tours par minute (tpm) et 3,1 μm à 200 tpm. L'influence de la vitesse d'agitation résiderait ici dans une fragmentation des gouttelettes de coacervats formées. Une autre étude effectuée sur le complexe β -lactoglobuline et la gomme d'acacia par **Schmitt et al., (Schmitt et al., 1998)**, ont pu montrer qu'avec un ratio (4

:1), à pH 4.2 et une concentration totale en polymères de 0,1%, par un suivi de l'absorbance à 650 nm et par microscopie à contraste de phases, que la taille des coacervats était dépendante du temps d'agitation. Après une courte durée 15 s d'agitation, des coacervats de petite taille de 1 μm étaient obtenus, par contre après 60 s d'agitation leur taille passe à (10-25 μm).

I-11. Diagramme de phase

L'incompatibilité d'un système protéines/polysaccharides peut être représentée à l'aide d'un diagramme de phase. La courbe séparant la zone de compatibilité et d'incompatibilité se nomme la binodale. La co-solubilité des deux polymères se situe sous la binodale et l'incompatibilité des deux polymères est représentée par la région au-dessus de la binodale. Dans cette dernière région, les systèmes protéine/polysaccharides/eau se sépareront généralement en deux phases puisque les forces répulsives sont fortes entre les deux polymères. Sous la binodale, les polymères co-solubles formeront toutefois des solutions à une seule phase puisque les concentrations de chaque constituant ou d'au moins un des deux constituants est sous le seuil critique de séparation. Les forces de répulsion entre les polymères ne sont pas assez élevées pour entraîner une incompatibilité visible soit par turbidité ou séparation de phases (**Figure II.10**) (**Tolostoguzov, 1995**).

Plusieurs facteurs influencent le seuil de séparation de phases et par le même fait, l'allure d'un diagramme de phases comme par exemple le type et la structure des protéines (**Tolostoguzov, 1995**). En général, pour des systèmes contenant des protéines globulaires (comme les protéines de lactosérum) et des polysaccharides, la séparation de phases se produit quand la concentration totale en macromolécules du système excède les 4%, et varie selon le pH et la force ionique (**Tolostoguzov, 1997**). Par contre, pour des systèmes protéines/protéines, la concentration est généralement de 15% et pour des systèmes caséines/polysaccharides ou gélatine/polysaccharides, elle est généralement sous 3% (**Tolostoguzov, 1997**). Pour ce qui est des polysaccharides, plus celui-ci est hydrophile, linéaire et de poids moléculaire élevé, plus la séparation de phases est plus remarquable (**Grinberg, et Tolstoguzov, 1997**).

I-12. Intérêt des complexes protéines-polysaccharides

La complexation entre protéines et polysaccharides est un moyen d'améliorer les propriétés fonctionnelles de chaque biopolymère. Ces propriétés peuvent être modulées en contrôlant les conditions physico-chimiques de formation des complexes (pH, force ionique, température...). Ces propriétés (hydratation, structures, et interfaces) sont connues et certaines applications industrielles en découlent (**Tableau I.4**).

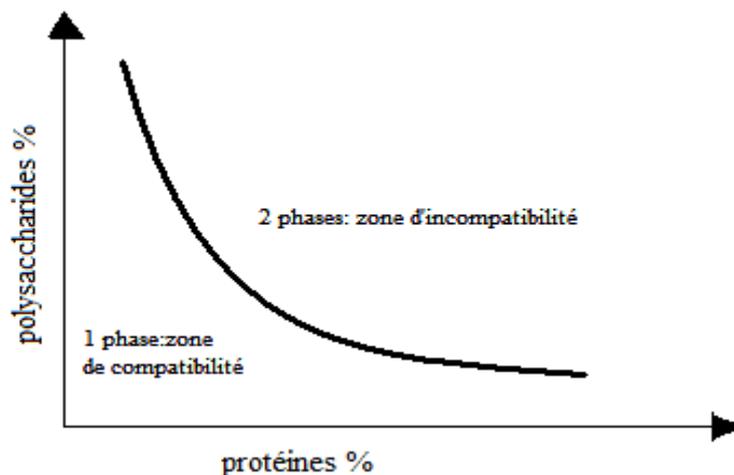


Figure I.10: Représentation d'un diagramme de phases (**Tolostoguzov, 1995**).

Les complexes protéines-polysaccharides sont utilisés en industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, dans les biotechnologies et en médecine. La complexation entre protéines et polysaccharides peut être appliquée dans la purification des molécules et en particulier des protéines. **Montilla et al.**, (**Montilla et al., 2007**) ont montré qu'il était possible de récupérer jusqu'à 90 % de la β -lactoglobuline contenue dans du lactosérum de fromage par complexation avec du chitosane. **Oliveira et al.**, (**Oliveira et al., 2007**) ont, par exemple, évalué la résistance des microcapsules contenant *Bifidobacterium lactis* et *Lactobacillus acidophilus* au séchage, au stockage (120 jours, entre 7 et 37 °C) et leur tolérance, *in vitro*, aux pH acides (pH 1,0 et 3,0).

L'encapsulation permet également d'assurer une libération contrôlée d'arômes avant ou pendant la consommation de certains aliments ou même de masquer le mauvais goût de certains matériaux biologiquement actifs (**Gouin, 2004**). Les complexes protéines / polysaccharides sont aussi utilisés en industrie alimentaire afin d'améliorer et de stabiliser (gélifiants, texturants, stabilisation des interfaces) les formulations alimentaires (**Capitani et al., 2007**). Parmi les domaines importants impliquant l'utilisation de complexes protéines / polysaccharides, il y a celui de la synthèse de biomatériaux, qui sont utilisés comme

biomatériaux ou matrices en ingénierie tissulaire. Cela permet le contrôle de la structure et de la morphologie de ces matériaux (**Velema et Kaplan, 2006**).

Tableau 1.4: Exemples d'application des complexes protéines-polysaccharides.

Complexes protéine- Polysaccharide	Utilisations	Domaines d'application	Références
---	---------------------	-----------------------------------	-------------------

Collagène / Gomme xanthane, Alginate	Biomatériel	Médical, pharmacie	(Easton et Gorham, 1986)
Collagène / Glycoaminoglycane	Derme artificiel	Médical	(Ellis et Yannas, 1996)
Gélatine / Gomme d'Acacia	Encapsulation de méthoxybutropate (anti- inflammatoire)	Pharmacie	(Palmieri <i>et al.</i> , 1999)
Immunoglobuline / Alginate, Cellulose, Pectine	Purification des immunoglobulines du jaune d'oeuf	Alimentaire	(Chang <i>et al.</i> , 2000)
Lactosérum / Gomme xanthane	Substitut de matières grasses (gélifiant, texturant)	Alimentaire	(Laneuville <i>et al.</i> , 2005)
Gélatine / Gomme d'Acacia	Encapsulation d'huiles essentielles	Alimentaire, cosmétique	(Yeo <i>et al.</i> , 2005)
Gélatine / Gomme gellane	Encapsulation (probiotiques)	Alimentaire	(Anal et Singh, 2007)
Protéines du lactosérum /Gomme xanthane	Encapsulation de vitamine B1	Alimentaire	(Benichou <i>et al.</i> , 2007)
β -lactoglobuline / Chitosane	Purification de la β -lactoglobuline	Alimentaire	(Montilla <i>et al.</i> , 2007)
Caséine / Pectine	Encapsulation de <i>Bifidobacterium lactis</i> et de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alimentaire	(Oliveira <i>et al.</i> , 2007)
β -lactoglobuline / Pectine	Encapsulation de l'acide docosahexaénoïque (DHA)	Alimentaire	(Zimet et Livney, 2009)

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

II-1. Matériels

La gélatine est d'origine bovine (type B), provient de la firme Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany), il s'agit d'une poudre issue d'un (lot n° 062K158). Elle a un pIE 5,51, un bloom 225, un poids moléculaire moyen Mn 243000 g/mole et une viscosité intrinsèque de 0,633m³/Kg. Sa composition ionique se résume comme suit: Na⁺ (0,15%), Mg²⁺ (0,01%), Cl⁻ (0,043%), Ca⁺² (0,06%).

La carboxymethylcellulose sodique en poudre (lot n° *K213) est achetée auprès de la société Merckeurolab ZI (De Vaugeneau, France). Son degré de substitution et sa viscosité sont respectivement 0,70-0,85 et 300-600 (cps). Son poids moléculaire moyen Mn est autour de 340 000 g/mole. La composition ionique de cette poudre est comme suit: Na⁺ (3,02%), Mg⁺² (0,01%), Cl⁻ (0,096%), Ca⁺² (0,0066%). Tous les autres réactifs sont de grade analytique (Sigma-Aldrich Co. Steinheim, Germany).

II-2. Préparation des solutions tampons

Pour ajuster les pH des différentes solutions préparées, nous avons préparé différentes solutions tampons à différents pH et volumes selon les modes opératoires décrits dans les **Tableaux II.1-3**:

a- solution tampon: pH 3,4 -7,8

On prépare au départ une solution de phosphate de sodium disodique (Na₂ HPO₄) (0,50 M) et une solution d'acide citrique (C₆ H₈ O₇) (0,50 M). Puis, on les mélange selon les volumes donnés dans le **Tableau II.1**. La dilution se fait jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée.

b- solution tampon: pH 8,3 et 9,2

Le même mode opératoire suivi précédemment est utilisé pour préparer les solutions à pH 8,3 et 9,2. Dans ce cas, l'acide borique et le chlorure de potassium (H₃BO₃, KCl) sont à 0,20 M. Puis on les mélange selon les volumes donnés dans le **Tableau II.2**. La dilution se fait jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée.

c- solution tampon: pH 11,7

À ce pH, deux solutions sont préparées, une solution de phosphate de sodium disodique (Na₂ HPO₄) à 0,05M et une seconde solution de soude (NaOH) à 0,20M, on procède de la même manière qu'auparavant. Le mélange des deux réactifs se fait selon les volumes donnés dans le (**Tableau II.3**). La dilution se fait aussi jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée.

Tableau II.1: préparation des solutions tampons pH (3,4 -7,8).

pH	Na₂HPO₄ (0,50M)	Acide citrique (0,50M)
3,4	22,80 ml	28,60 ml
4,2	33,12 ml	23,44 ml
5,2	42,88 ml	18,56 ml
6	50,52 ml	14,74 ml
6,8	61,80 ml	9,10 ml
7	65,88 ml	7,06 ml
7,8	76,60 ml	1,70 ml

Tableau II.2: Préparation des solutions tampons pH (8,3 et 9,2) .

pH	KCl,H₃BO₃ (0,20 M)	NaOH (0,20 M)
8,3	50 ml	5,90 ml
9,2	50 ml	26,70 ml

Tableau II.3: préparation des solutions tampons de pH (11,7) .

pH	Na₂HPO₄ (0,05 M)	NaOH (0,20 M)
11,7	50ml	4,1ml

II-3. Préparation des solutions de protéines natives

La concentration de la dispersion mère aqueuse de gélatine ayant comme pH initial (pH 5,13), est exprimée en pourcent par poids (% en poids). Des quantités spécifiques de granulés de gélatine sont dispersées dans de l'eau distillée, contenant 0,01% d'azide de sodium (NaN_3) pour prévenir une éventuelle contamination microbienne, sous agitation douce à $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pendant au moins 2 h. La dispersion est laissée à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 h pour permettre l'hydratation complète des macromolécules. Cette solution est ensuite ajustée à un pH 4,2 (**Lemay, 2000**). L'ajustement du pH de la dispersion de la gélatine est obtenu à température ambiante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ par addition successive de (0,6 N HCl) (**Schmitt, 2000**). La solution de gélatine est ensuite séparée en plusieurs parties qui sont ajustées à différentes valeurs de pH par des solutions tampons préparées dans l'intervalle de pH 3,4-11,7.

II-4. Préparation des solutions de protéines prétraitées

On prépare une solution mère de gélatine par la même méthode précédente et lorsqu'on assure la bonne hydratation des protéines, un prétraitement thermique est imposé à cette solution, durant 3 minutes entre ($55\text{-}60^\circ\text{C}$) dans un bain-marie sachant que son pH est aux alentours de 5,23. La solution est ajustée à pH 4,2 (HCl 0,6N) (**Lemay, 2000**). Cette solution est utilisée sans traitement supplémentaire afin de vérifier l'effet de la dénaturation thermique sur la stabilité thermique de la gélatine et sur son comportement en solution. La solution de gélatine est ensuite séparée en plusieurs parties qui sont ajustées à pH 5,2, 7,0.

II-5. Préparation des solutions de polysaccharides

Des quantités spécifiques de NaCMC sont dispersées dans l'eau distillée chaude ($75\text{-}80^\circ\text{C}$) ayant comme pH initial 6,83, sous une forte agitation pendant au moins 4 h. La solution est laissée à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 h heures pour assurer une bonne hydratation des macromolécules de NaCMC. La solution de NaCMC est également séparée en plusieurs parties qui sont ajustées à des valeurs de pH par des solutions tampons préparées dans la gamme 3,4 à 11,7. Toutes les solutions étaient claires et ne démontraient aucun précipité.

II-6. Préparation des mélanges protéines-polysaccharides

Les solutions aqueuses de gélatine (5,0 wt%) et NaCMC (3,0 wt%) sont préparées séparément. Les effets du pH et du ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps) sont suivis en mélangeant des solutions de gélatine et de NaCMC à différentes valeurs de pH (3,4 à 11,7) et à différentes concentrations totales en biopolymères (0,1-1 wt%) en absence et en présence de

NaCl (2M), CaCl₂ (0,3M) et glucose (2M). Des proportions de mélange distinctes sont utilisées pour obtenir un ratio Pr : Ps allant de 8: 1 à 1: 8.

II-7. Méthodes

II-7-1. Détermination du point isoélectrique (pIE) de la gélatine par conductimétrie et pHmétrie

Nous avons déterminé la valeur du pIE par la méthode de conductimétrie, méthode décrite par **Xing et al., (Xing et al., 2004)**. On procède à des ajouts successifs de 0,2 ml d'une solution de soude NaOH (1,0 wt%) dans environ 40 ml d'une solution de gélatine à (5,0 wt%). On suit l'évolution de la conductivité de la solution en fonction du pH de la solution (**Tableau II.4**). Le point isoélectrique est repéré par le point d'inflexion de cette courbe $\kappa = f(\text{pH})$ (**Figure II.1**).

Tableau II.4: Les différentes valeurs de conductivité et de pH pour une solution de gélatine obtenues par conductimétrie couplée à la pH métrie.

Volume du NaOH (ml)	0	5	10	15	20	25
Conductivité (μs)	0,162	0,152	0,711	0,482	0,248	0,293
pH	4,70	4,99	5,51	6,47	8,43	9,24

La **figure II.1** montre le point d'inflexion à 0,711 et qui nous permet de déduire la valeur du point isoélectrique de notre gélatine qui est approximativement à 5,51.

II-7-2. Spectroscopie UV-Visible

II-7-2-1. Principe

L'influence du pH, du ratio de mélange, de la concentration totale en biopolymères et de l'addition de (NaCMC, NaCl, CaCl₂ et de glucose), a été étudiée en suivant la variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm. Cette méthode est couramment utilisée afin de prédire les zones de pH d'interaction maximum entre les macromolécules (**Koh et Tucker, 1988a**). La longueur d'onde de 650 nm a été choisie car elle se situe hors de la zone d'absorption des

acides aminés aromatiques constituant la protéine. La variation d'absorbance est équivalente à la densité optique du mélange et pourra donc spécifiquement être attribuée à la formation de particules (complexes macromoléculaires, coacervats ou précipités) après interaction électrostatique entre les deux macromolécules.

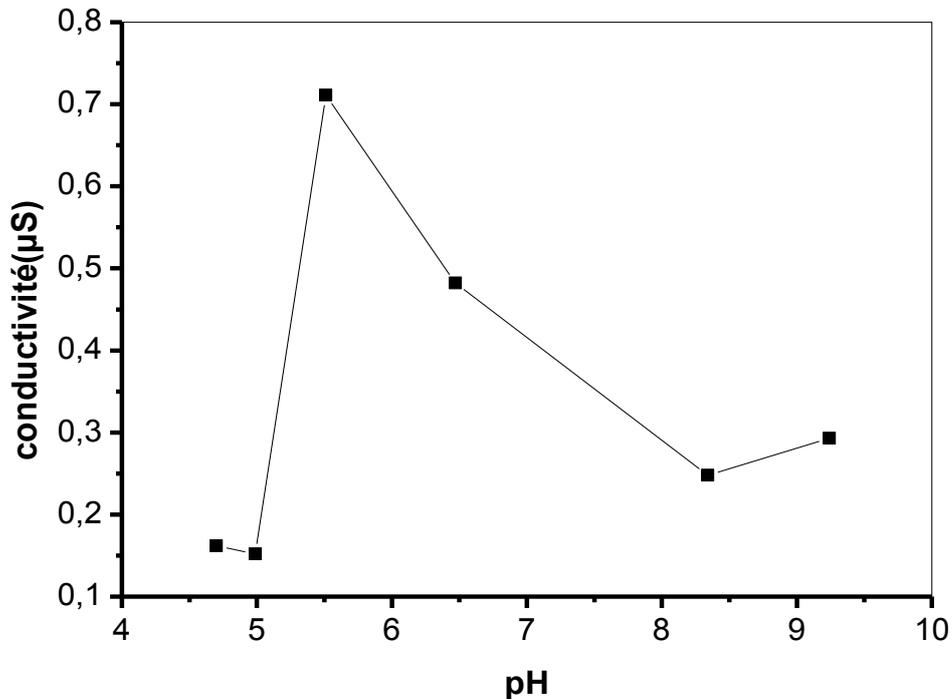


Figure II.1: Détermination du point isoélectrique de la gélatine par conductimétrie couplée à la pHmétrie.

II-7-2-2. Appareil utilisé

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis de type (UNICAM-UV-Vis à double faisceau, Analytik Jena AG Analytical Instrumentation, Jena, Allemagne).

II-7-3. Observations visuelles du mélange gélatine/NaCMC/eau

La séparation de phase macroscopique obtenue dans le mélange gélatine/NaCMC/eau a été suivie visuellement à 1% pour des mélanges obtenus à pH 4,2, 6,8, 7,8 et 8,3. Cette concentration totale a été choisie car elle permet d'obtenir des phases ayant des volumes suffisamment importants pour pouvoir être précisément observés. Après 5 jours, les tubes contenant les mélanges à des ratios variant de 1 : 8 à 8 : 1 ont été photographiés à l'aide d'un appareil photo numérique MVC-FD91 (Sony).

II-7-4. Elaboration des diagrammes de phases

Les diagrammes de phases sont élaborés à partir des caractéristiques visuelles des solutions. Les différents mélanges G/NaCMC (0,1 à 1% de protéines et 0,1 à 1% de polysaccharides) en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose sont réalisés dans des tubes en polystyrène de contenance 12 ml qui ont été agités 1 h et centrifugés pendant 30 minutes. Les mélanges ont ensuite été évalués selon les critères suivant : **clair**, lorsqu'il était possible et facile de voir au travers de la solution, **trouble**, lorsqu'il était difficile de voir au travers, et **opaque** lorsqu'il n'était pas possible de voir au travers. Le nombre de phases est évalué selon que la séparation de phases était évidente ou non. Puisque les solutions de gélatine seule et de NaCMC seule sont toutes les deux claires. La présence de turbidité est causée par des interactions entre les protéines et les polysaccharides (**Michon et al., 1996**).

II-7-5. Electrophorèse

II-7-5-1. Principe

La nature polyélectrolytique des macromolécules utilisées dans cette étude entraîne la formation d'une double couche ionique autour de celles-ci, mais également une structuration des molécules de solvant à leur voisinage (**Hunter, 1986**). Il est alors possible d'estimer les interactions macromolécule-macromolécule et macromolécule-solvant par le biais de la mesure de la mobilité électrophorétique des particules en solution (**Douglas et al., 1995**). Les mesures sont réalisées sur les solutions de gélatine ainsi que sur les dispersions G/NaCMC en absence et en présence de NaCl. La concentration des solutions est (3,0 wt%) de gélatine, (2,0 wt%) de NaCMC à pH 4,2 et à différents ratios.

L'application de l'électrophorèse capillaire à l'étude des complexes est possible lorsque les charges nettes portées par la protéine, le polysaccharide et le complexe ont des valeurs suffisamment différentes.

Lors d'une analyse par électrophorèse capillaire, le réservoir d'introduction, le capillaire ainsi que le réservoir de récupération sont d'abord remplis de tampon. L'introduction de l'échantillon dans le système est ensuite effectuée en remplaçant l'entrée du capillaire dans le Vial de l'échantillon et en appliquant une pression ou un courant électrique pendant quelques secondes. Le capillaire est ensuite replacé dans le réservoir d'introduction avant d'appliquer le courant électrique. Lequel induit la migration de l'échantillon dans le capillaire. Le

mouvement du tampon contenu dans le capillaire est appelé flux-électrosmotique. Les solutés migrant à différentes vitesses dans le capillaire sont détectés par détecteur, lequel envoie le signal à l'ordinateur. Les données traitées sont présentées sous la forme d'un électrophérogramme où les différents pics représentant les composés séparés à des temps de migration différents; le temps 0 correspondant au moment où le courant électrique est appliqué.

II-7-5-2. Appareil utilisé

L'électrophorèse utilisée dans cette étude est de type CAPILLARYS 2 qui est un automate d'électrophorèse capillaire, piloté par un micro ordinateur, et réalisant le traitement des résultats obtenus.

II-7-6. Spectroscopie infrarouge (IR-TF)

II-7-6-1. Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique d'analyse physico-chimique qui sonde les liaisons entre les noyaux atomiques et leurs arrangements. Cette méthode permet d'accéder directement à l'information moléculaire, à la nature chimique et à l'organisation conformationnelle et structurale des matériaux analysés.

Pour déterminer l'effet du pH sur l'interaction (complexation) de NaCMC avec la gélatine, des films de (1% wt%) de gélatine, NaCMC, gélatine/NaCMC, en présence et en absence de NaCl, CaCl₂ et de glucose sont préparés pour une meilleure lecture du spectre.

II-7-6-2. Appareil utilisé

Les mesures par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) sont réalisées avec un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) de type PERKIN ELMER 1000 (Waltham, MA, USA). Chaque spectre a été enregistré entre 500 cm⁻¹ et 4000 cm⁻¹.

II-7-7. Radiocristallographie par diffraction des rayons X (DRX)

II-7-7-1. Principe

La diffractométrie de rayons X (DRX) est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction n'ayant lieu que sur la matière cristalline et fait partie des méthodes de diffusion élastique. Cette analyse consiste à appliquer un rayonnement de la longueur d'onde des rayons X sur un échantillon. Le rayonnement pénètre dans le

cristal. Il y a absorption d'une partie de l'énergie et excitation des atomes avec émissions des radiations dans toutes les directions. Les radiations émises vont engendrer un faisceau cohérent qui pourra être détecté (Samaké, 2008).

L'observation d'un rayonnement diffracté est donc soumise à des conditions relatives à l'existence d'interférences constructives ou cohérentes. La loi de **Bragg** établit la condition essentielle à la diffraction, à savoir: deux rayons diffusés par un cristal sont en phase et s'additionnent si la différence entre leurs chemins parcourus au sein du cristal est égale à n fois (n= nombre entier) leur longueur d'onde:

$$2. d_{hkl} \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda$$

Avec :

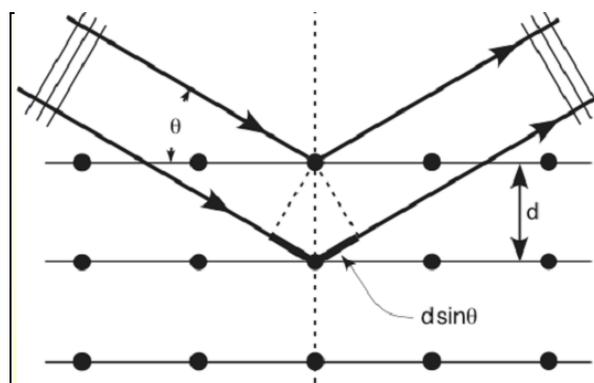
d: la distance inter réticulaire ;

θ : l'angle de la déviation ;

n: Le nombre entier appelé «ordre de diffraction» ;

λ : la longueur d'onde des rayons X.

Cette relation permet de déterminer les équidistances des différentes familles de plans caractéristiques du matériau à analyser à partir des valeurs de l'angle d'incidence. λ est la longueur d'onde de la raie $K_{\alpha 1}$ du cuivre ($1,5406 \times 10^{-10}$ m).



II-7-7-2. Appareil utilisé

L'appareil utilisé est un diffractomètre de type D8-ADVANCE-BRUKER-AXS. Les Rayons X sont produits par une anticathode de cuivre alimentée sous 30KV et 25mA. La radiation $\text{Cu}_{K\alpha}$ ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$) séparée au moyen d'un monochromateur arrière en graphite courbé. La fente de divergence et d'antidiffusion sont programmables. Le diagramme des échantillons est enregistré sur un domaine angulaire compris : $5-70^\circ$ (2θ) par pas de 0.05. Le temps de comptage est de 1 seconde par pas. Le goniomètre vertical $\theta - 2\theta$ en géométrie *Bragg Brentano*. Le détecteur est à scintillation.

II-7-8. Polarimétrie

II-7-8-1. Principe

La polarimétrie est une technique spectroscopique fondée sur le principe suivant :

L'interaction de la lumière polarisée monochromatique avec les électrons de valence des atomes d'une substance dépend de la répartition spatiale des atomes et de la longueur d'onde (**Jirgensons, 1969**). L'activité optique a son origine dans l'asymétrie du milieu réfractant: elle provient soit de la présence de carbones asymétriques (C^*), soit de l'asymétrie de la chaîne elle-même. Cette propriété se traduit au niveau macroscopique par la rotation du plan de polarisation de la lumière incidente. Si l'on appelle α l'angle de rotation du plan de polarisation, le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{\lambda,T}$ est défini par :

$$[\alpha]_{\lambda,T} = \frac{\alpha_{\lambda}}{c \cdot l}$$

Avec: α : Angle de rotation mesuré en degrés.

C : Concentration en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

L : longueur de la cuve optique en dm.

La dispersion rotatoire ou pouvoir rotatoire est la variation de l'angle α_{λ} en fonction de la longueur d'onde. Elle est mesurée par polarimétrie.

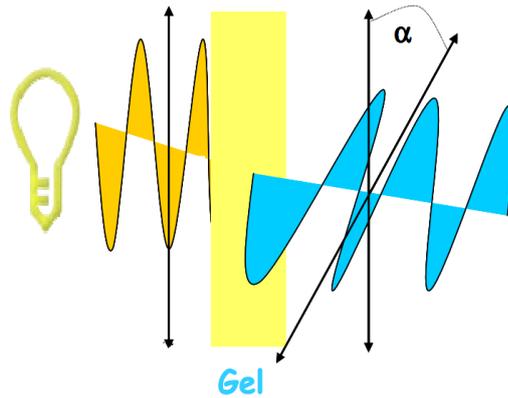


Figure II.2: Schéma de la méthode de mesure par polarimétrie (Giraudier, 2004).

Lorsqu'il y a absorption, le module de la composante gauche est différent de la composante droite et les deux composantes ne tournent pas à la même vitesse: la lumière transmise est polarisée elliptiquement. Le milieu possède une absorption différentielle mesurée par dichroïsme circulaire (Giraudier, 2004).

➤ **Cas du collagène et de la gélatine**

Dans le cas des transitions conformationnelles pelotes-hélice, on observe une variation importante du pouvoir rotatoire. Pour le collagène, Von Hippel et Wong, (Von Hippel et Wong, 1963) ont montré que pour des longueurs d'onde supérieures à 300 nm, la dispersion rotatoire suit une loi de Drude à un seul terme :

$$[\alpha]_{\lambda,T} = A \frac{\lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

Avec $\lambda_c = 210 \pm 5 \text{ nm}$

Cette relation s'applique aussi bien aux solutions de bâtonnets natifs et dénaturés. Seule l'amplitude A du pouvoir rotatoire dépend du taux d'hélicité du système. Le collagène et la gélatine ont le même pouvoir rotatoire spécifique à l'état dénaturé, puisque celui-ci reflète la composition en acides aminés. On peut ainsi suivre la renaturation ou la fusion des hélices en suivant l'évolution du pouvoir rotatoire au cours d'un abaissement ou d'élévation de température.

La même loi est vérifiée sur des solutions et des gels de gélatine, avec la même valeur de λ_c . Cette particularité conduit à estimer le « taux d'hélicité » (χ) dans les gels de gélatine à partir des mesures de pouvoir rotatoire, par la relation:

$$\chi = \frac{\text{nombre de résidus en conformation hélicoidale}}{\text{nombre total de résidus}} = \frac{[\alpha]_{\lambda}^{\text{mesuré}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{pelote}}}{[\alpha]_{\lambda}^{\text{collagène}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{pelote}}}$$

- Le collagène est considéré comme 100% d'hélices, on retiendra la valeur à 40° et pH 7,4: $[\alpha]_{436\text{nm}}^{\text{collagène}} = - 800 \pm 10 \text{ } ^\circ\text{cm}^{-3}.\text{g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$
- La pelote correspond au 0% d'hélice, on retiendra à 40°C et pH 7,4: $[\alpha]_{436\text{nm}}^{\text{pelote}} = - 274 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{cm}^{-3}.\text{g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$
- \mathcal{X} représente la fraction de monomères (acide aminés) ayant adopté la conformation hélicoïdale (hélice gauche). Le produit du taux d'hélices par 100 représente le pourcentage d'hélices gauches dans la solution. Ainsi on peut suivre quantitativement au niveau moléculaire la transition pelote/hélice dans notre système (**Giraudier, 2004**).

➤ **Corrections en présence d'autres composés**

Au cours de l'étude nous ajouterons, d'autres composés à la solution de gélatine à savoir la NaCMC, NaCl, CaCl₂ et le glucose. Nous avons vérifié que les mesures restaient significatives (**Giraudier, 2004**).

$$\alpha \text{ mesuré} = \alpha \text{ gélatine} + \alpha \text{ composé}$$

Le taux d'hélicité (χ):

$$\chi = \frac{\frac{[\alpha]_{\lambda}^{\text{mesurée}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{composé}}}{\text{IC gélatine}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{pelote}}}{[\alpha]_{\lambda}^{\text{collagène}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{pelote}}}$$

La polarimétrie permet de mesurer le pouvoir rotatoire d'une protéine. Ce pouvoir rotatoire est spécifique pour le collagène de type I, grâce à sa structure caractéristique en hélice de type polyproline et révèle une structure en hélice gauche adoptée par les chaînes α individuelles. La torsion due à la formation de la triple hélice a peu d'effet sur la rotation optique mais la dénaturation de la structure individuelle de chaque chaîne α entraîne une diminution importante du pouvoir rotatoire (**Giraudier et al., 2004**).

Celui-ci peut également varier avec le pH, la force ionique ou une augmentation de température. Par conséquent la mesure du pouvoir rotatoire permet de fournir directement des informations sur l'état de la triple hélice du collagène (**Giraudrier *et al.*, 2004**), ainsi que pour les solutions ou les gels, qui permet aussi de détecter et de quantifier le changement de conformation pelote/hélice en fonction du temps ou de la température (**Hellio-Serughetti, 2004**).

II-7-8-2. Appareil utilisé

Dans notre étude la mesure des différents paramètres polarimétriques nous procure des informations sur l'état de la triple hélice d'une part. D'autre part le calcul du pouvoir rotatoire nous permet le calcul du taux de cette hélice, pour ces fins nous avons utilisé un polarimètre qui est composé d'un système qui permet la génération de différents états de polarisation et une unité d'analyse qui permet d'obtenir la matrice de Mueller du milieu. Le dispositif expérimental peut aussi bien être utilisé en transmission qu'en réflexion suivant le type de cible à étudier (**Cherif, 2010**).

La source utilisée est une lumière laser He-Ne monochromatique à polarisation linéaire. Il s'agit de générer de façon contrôlée des états de polarisation que l'on envoie sur l'échantillon. Enfin, la polarisation de la lumière émergente est mesurée afin de caractériser les modifications induites par l'échantillon sur les états de polarisation incidents (**Cherif, 2010**).

Notre dispositif expérimental est monté sur une table bien ajustée. La source utilisée est une lumière laser He-Ne monochromatique à polarisation linéaire.

- Un polariseur : permet de polariser rectilignement une lumière incidente non polarisée.
- Un analyseur : pour déterminer la direction de polarisation d'une lumière déjà polarisée rectilignement.
- Une cuve : doit être en verre, son épaisseur $L=10$ mm.
- Webcam : pour détecter la lumière.

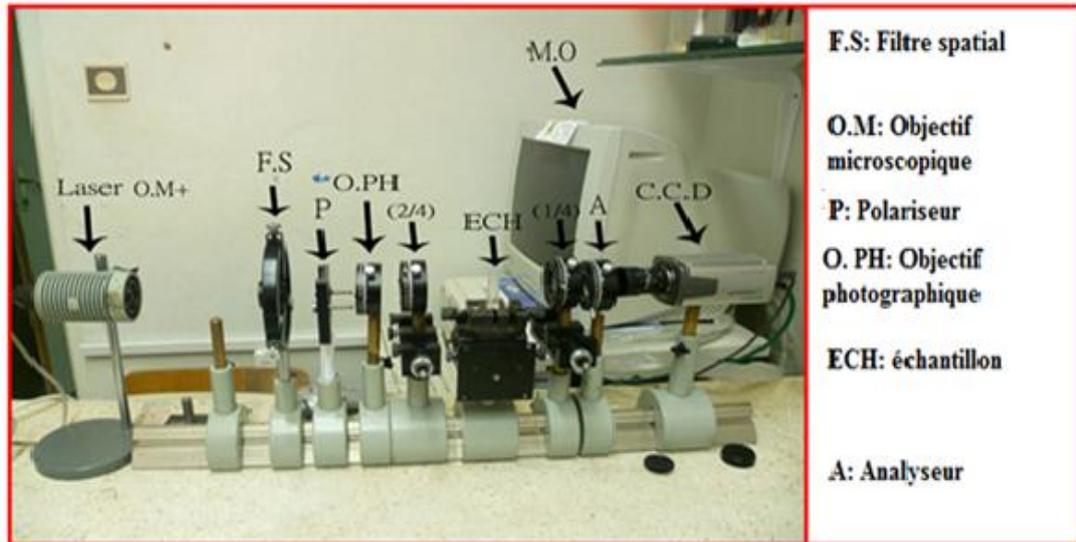


Figure II.3: Schéma représentatif d'un polarimètre de Mueller.

II-7-9. Microscopie à force atomique (AFM)

II-7-9-1. Principe

L'AFM se base sur les interactions physiques entre l'échantillon à analyser et la pointe AFM. Elle est utilisée pour étudier la topographie des surfaces avec la possibilité d'obtenir une résolution à l'échelle de l'atome. Cette technique a pour élément de base une pointe souple dont l'extrémité a un rayon de courbure de quelques dizaines de nanomètres. Cette pointe est en contact avec l'échantillon qui est lui-même fixé sur un scanner en céramiques piézo-électriques.

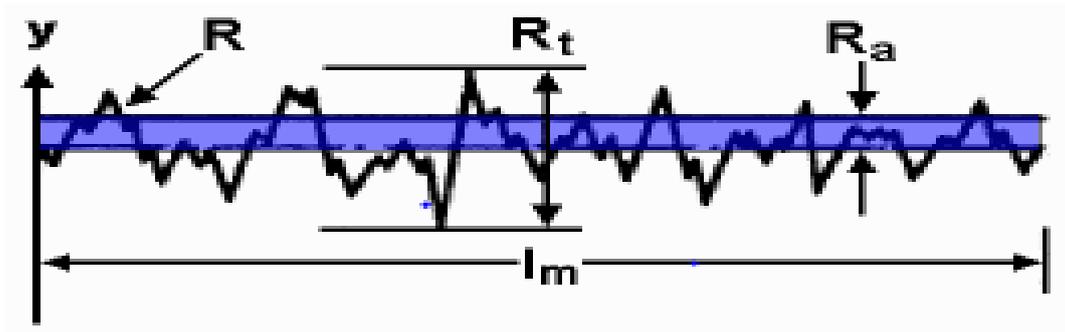
Lorsque l'on applique une tension à ces céramiques, elles se dilatent ou se contractent ; ce qui permet de déplacer l'échantillon dans les trois directions de l'espace x , y , z avec une précision de l'ordre de $0,1\text{nm}$. Un laser est réfléchi sur la pointe AFM puis collecté dans une photodiode à quatre cadrans. Le levier (cantilever) est "microfabriqué" en nitrure de silicium Si_3N_4 avec des dimensions de 100 à $300\mu\text{m}$ de longueur, 10 à $60\mu\text{m}$ de largeur et $0,5$ à $3\mu\text{m}$ d'épaisseur (**Figure II.4**).

À l'aide de l'AFM, il est aussi possible de déterminer deux rugosités : la rugosité arithmétique moyenne R_a et la rugosité quadratique moyenne R_q . R_a et R_q sont respectivement la valeur moyenne de la hauteur et la racine carrée de la valeur moyenne de Z^2 sur toute la zone d'analyse dont les différentes expressions mathématiques sont données comme suit :

✓ Rugosité moyenne arithmétique R_a (RMA):

Moyenne arithmétique de toutes les distances absolues du profil de rugosité R mesurée à partir de la ligne médiane du profil sur la longueur d'évaluation l_m (**Delaunois, 2002**).

$$R_a = \frac{1}{l_m} \int_{x=0}^{x=l_m} |y(x)| dx$$



✓ Rugosité moyenne quadratique R_q (RMQ):

Moyenne quadratique de toutes les valeurs du profil de rugosité R calculée sur la longueur d'évaluation l_m (**Delaunois, 2002**).

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l_m} \int_{x=0}^{x=l_m} y^2(x) dx}$$

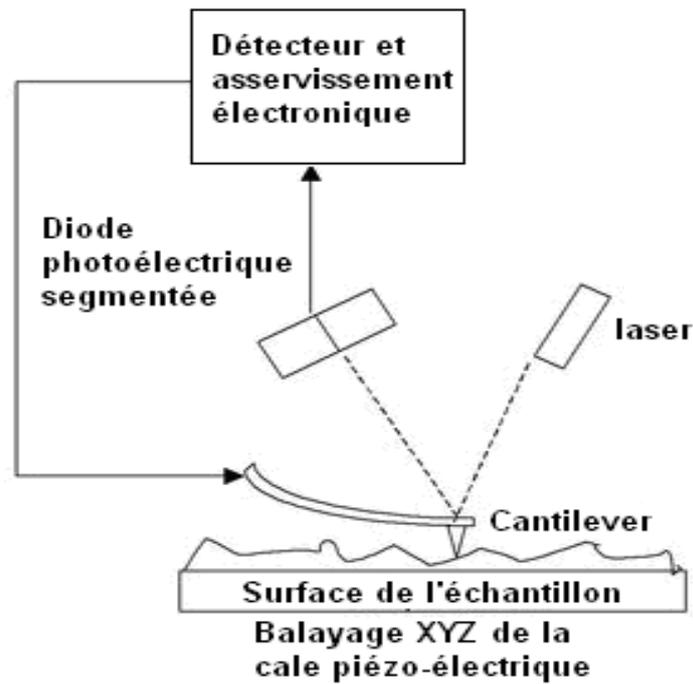


Figure II.4 : Schéma simplifié de fonctionnement d'un microscope à force atomique (Saint-aubin, 2010).

Il existe trois modes d'opérations en AFM : **(i)** le mode contact exploité dans cette étude, **(ii)** le mode non contact qui consiste en une oscillation de la pointe à la surface de l'échantillon sans jamais rentrer en contact avec celui-ci, et **(iii)** le mode tapping (ou contact intermittent) qui correspond à une oscillation de la pointe qui rentre en contact intermittent avec l'échantillon (Velzenberger, 2008).

- Le cantilever

Le cœur de l'AFM est représenté par le cantilever : un support où sont montées des pointes à son extrémité. Les stylets et cantilevers modernes sont fabriqués soit en silicium, en nitrure de silicium ou en diamant par microfabrication. Les cantilevers utilisés ont soit une forme triangulaire (ou en forme de " V ") ou soit une forme rectangulaire. Leur longueur varie entre 100 et 300 μm et leur épaisseur oscille de 0,5 à 3 μm . Les leviers sont souvent recouverts d'une fine couche d'or ou d'aluminium pour rendre les pointes réfléchissantes et détecter le laser (Moller *et al.*, 1999).

- Le mode contact

Le mode contact est le premier mode d'imagerie AFM à avoir été développé. La force d'interaction entre la pointe et la surface reste dans le régime répulsif. Ce mode d'imagerie peut fonctionner soit à hauteur constante (le microlevier est balayé à une hauteur constante

au-dessus de la surface) soit à force constante (la force avec laquelle le microlevier vient palper la surface est maintenue constante au cours du balayage par l'intermédiaire d'une rétroaction).

- Le mode non contact

Dans ce mode de fonctionnement on fait osciller le microlevier à sa fréquence de résonance avec une petite amplitude d'oscillation et relativement loin de la surface. Dans ces conditions la pointe n'est pas en contact avec la surface: la force d'interaction entre la pointe et la surface reste hors du régime répulsif à courte distance (d'où le nom de mode non contact).

- Le mode Tapping

Le mode Tapping représente la technique d'acquisition idéale pour la caractérisation d'échantillons mous ou élastiques (**Moller *et al.*, 1999**). Le mode Tapping est approprié pour l'analyse des polymères, d'échantillons biologiques et fonctionne également en milieu liquide. Malheureusement, ce mode manque de résolution. La précision maximale ($\leq 1\text{nm}$) ne peut être atteinte qu'en mode contact (**Velzenberger, 2008**).

II-7-9-2. Appareil utilisé

La topographie de la surface des films a été mesurée en utilisant le microscope à force atomique (AFM) de type Pacific nanotechnology (advancing nanotechnology) équipé d'un scanner et d'une cellule liquide en quartz. Les films ont été découpés à $10.14\ \mu\text{m}$. La microscopie est utilisée en mode contact à température ambiante ($21\text{-}24^\circ\text{C}$) à l'aide de pointes " V " en nitrure de silicium Si_3N_4 , dans lequel des changements dans l'amplitude de la pointe du cantilever de contact sur la surface du film pour fournir des signaux de rétroaction pour mesurer les variations de la topographie de la surface. A l'aide de l'AFM, il est aussi possible de déterminer deux rugosités : la rugosité arithmétique moyenne R_a et la rugosité quadratique moyenne R_q . R_a et R_q sont respectivement la valeur moyenne de la hauteur et la racine carrée de la valeur moyenne de Z^2 sur toute la zone d'analyse.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III-1. Caractérisation des mélanges gélatine/carboxyméthylcellulose sodique

III-1-1. Variation de l'absorbance des mélanges gélatine/NaCMC/eau à 650nm en fonction du pH et du ratio

L'influence du pH et du ratio protéine/polysaccharide (Pr : Ps) sur l'interaction entre la gélatine et la carboxyméthylcellulose sodique est étudiée à différentes concentrations totales en biopolymères, en suivant l'absorbance des mélanges à 650 nm. La variation d'absorbance peut donc être uniquement corrélée à l'apparition de particules. Nous considérons également que pour une valeur de pH donnée, une variation maximale de l'absorbance du mélange est liée à la formation d'un nombre maximum de particules formées et donc un maximum d'interaction entre les deux macromolécules (**Koh et Tucker, 1988a**).

Les résultats de variation d'absorbance à 650 nm obtenus pour le mélange gélatine/Na CMC /eau à une concentration totale de 0,1 wt % montrent que pour des ratios (Pr : Ps) compris entre 8:1 et 1:8, toutes les courbes présentent un maximum d'absorbance à pH 4,2, mis à part les mélanges obtenus pour les ratios Pr : Ps de 8 :1, 2 :1 pour lesquels le maximum semble se situer à des valeurs de pH égales à 5,2 et 11,7 respectivement (**Figure III.1**). Le maximum de variation d'absorbance à pH 4,2 est obtenu pour le ratio 1 :1. Nous considérons que pour une valeur de pH donnée, une variation maximale de l'absorbance du mélange est observée et donc attribuée à un maximum d'interaction entre les deux macromolécules (**Koh et Tucker, 1988a**).

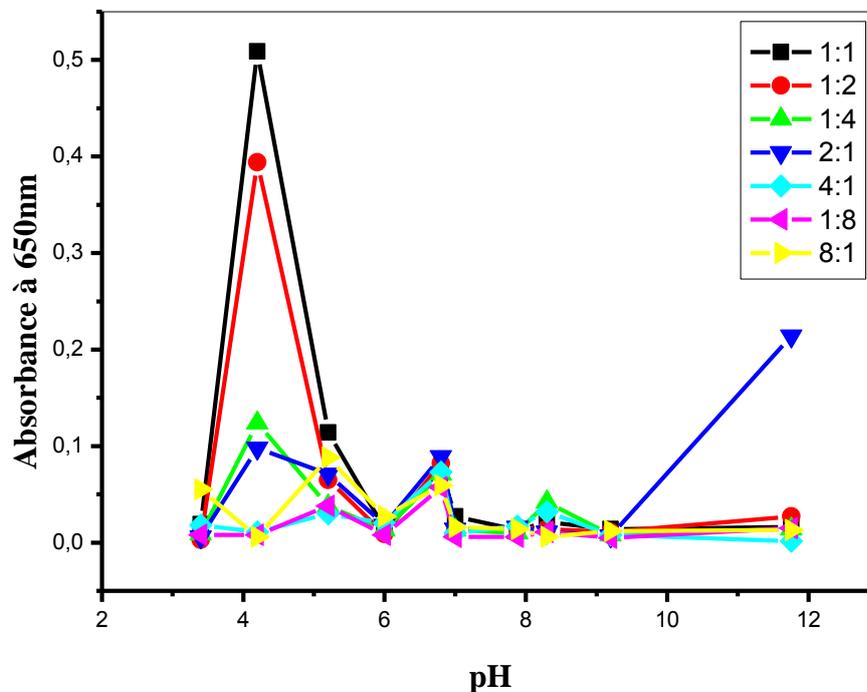


Figure III.1: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,1 wt% et à différents ratios.

Lorsque la concentration totale en biopolymères est de 0,5 wt%, la première différence marquante par rapport au cas précédent réside dans les valeurs plus élevées d'absorbance (**Figure III.2**). Ceci indique que l'augmentation de la concentration totale en biopolymères permet d'accroître le nombre de particules formées. Toutes les courbes présentent un maximum d'absorbance à pH 4,2, par contre le maximum de variation d'absorbance à pH 4,2, dans le cas de ce système est obtenu pour le ratio Pr : Ps de 2 :1.

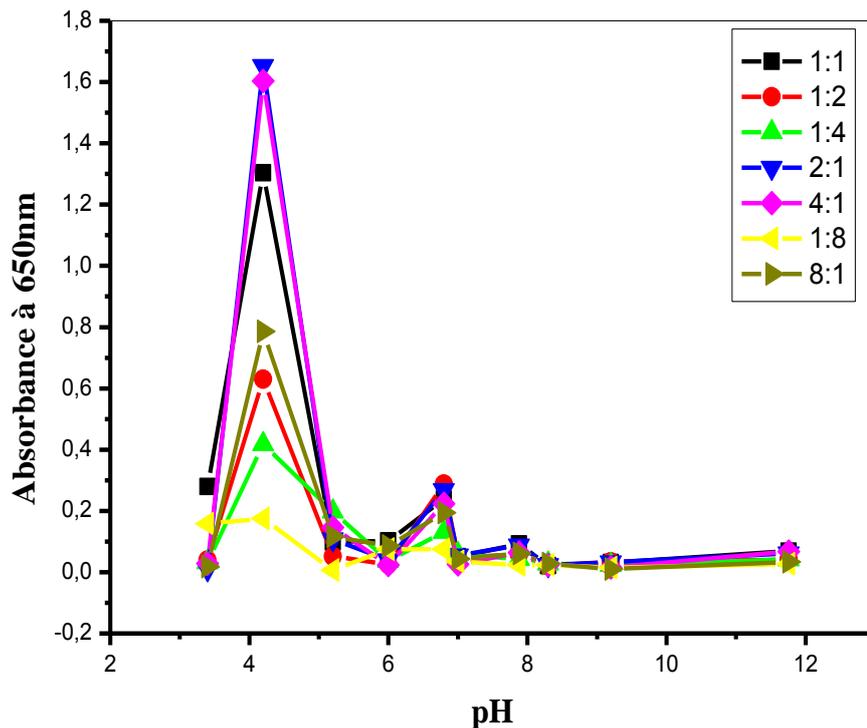


Figure III.2: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,5 wt% et à différents ratios.

Pour une concentration totale en biopolymères de 0,75 wt%, les résultats sont très similaires à ceux obtenus à 0,5 wt% (**Figure III.3**). Par contre, le maximum de variation d'absorbance à pH 4,2, dans ce cas est obtenu pour le ratio Pr : Ps de 4 :1.

Pour la dernière concentration totale en biopolymères testée à 1 wt %, les évolutions de l'absorbance présentent les valeurs les plus élevées en les comparant aux trois cas précédents. On remarque aussi que le maximum de variation d'absorbance à pH 4,2, dans le cas de ce système est semblable à celui obtenu pour le système à 0,1wt%, qui est obtenu pour le ratio Pr : Ps de 1 : 1, mais avec des valeurs d'absorbance plus élevées (**Figure III.4**).

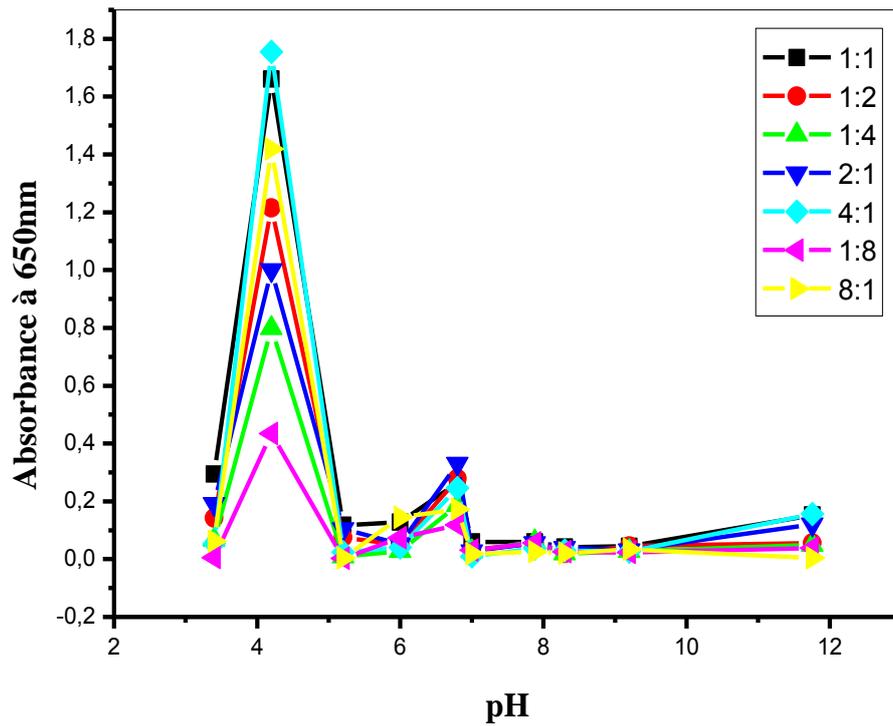


Figure III.3: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/ NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 0,75 wt% et à différents ratios.

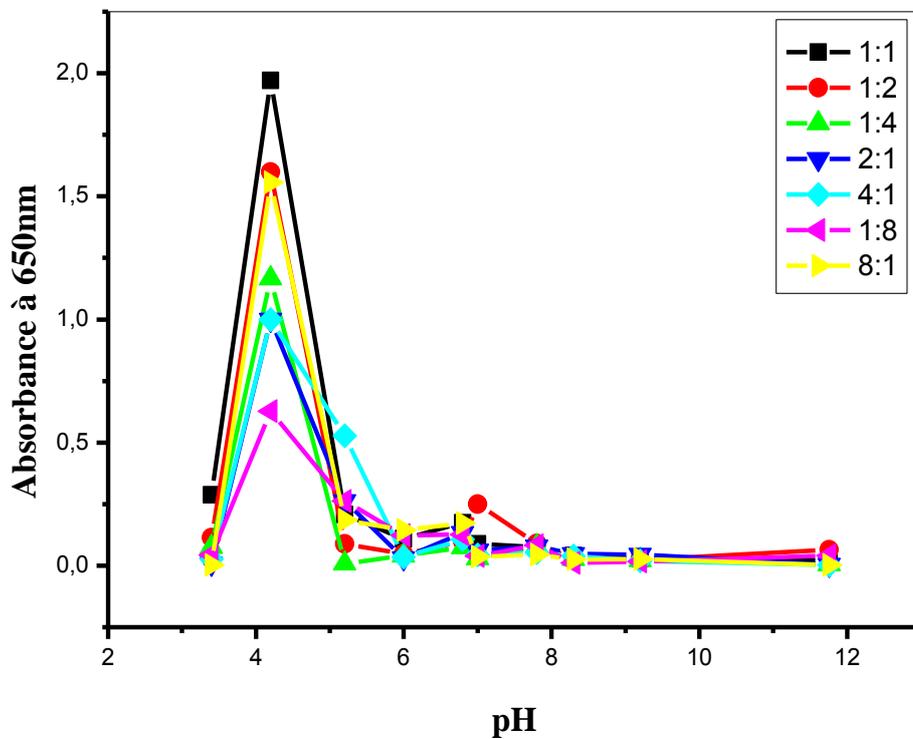


Figure III.4: Absorbance à 650 nm des mélanges gélatine/ NaCMC en fonction du pH à une concentration totale en biopolymère 1 wt% et à différents des ratios.

Les **figures III.1-4**, pour une concentration totale en biopolymère 0,1 wt% et 1 wt% respectivement, présentent un maximum de variation d'absorbance pour le ratio 1 : 1. Ce ratio massique a une influence capitale sur la solubilité des polyelectrolytes. Ces résultats sont en accord avec les travaux déjà réalisés par (**Feng et al., 2008**), qui ont constaté qu'une séparation de phase est généralement observée pour un ratio massique Pr : Ps (1 : 1) correspondant à la neutralisation des charges. Pour des ratios éloignés de 1 les polyelectrolytes sont solubles.

Des travaux réalisés par (**Xia et Dubin, 1994**) ont pu aussi montrer que le ratio massique protéine : polysaccharide (Pr : Ps) a une très grande importance sur le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe. En effet, à un pH et à une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules. Si les complexes sont de type stoechiométrique, c'est à dire que la neutralisation est obtenue pour des ratios de 1 : 1, tout ratio supérieur ou inférieur aura pour effet de solubiliser ces complexes et donc de diminuer la formation de coacervats d'une part (**Kaibara et al., 2000a**).

D'autre part, dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la CMC, (**Koh et Tucker, 1988 a-b**) ont par exemple montré que le volume de la phase constituant le coacervat était maximum pour un ratio de mélange de 1 : 1, pour lequel la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est obtenue. L'influence du ratio de mélange sur la formation de complexes a particulièrement bien été mise en évidence par **Bowman et al., (Bowman et al., 1997)** dans le cas d'un mélange entre de la gélatine et du poly (styrène sulfonate) de sodium.

Généralement pour la plupart des systèmes, on observe aussi la précipitation pour un ratio de charges proche de 1. Ainsi pour la complexation entre un copolymère d'acrylonitrile et de méthallyl sulfonate de sodium (ANS) et un copolymère d'acrylonitrile 2-méthyl-5-vinylpyridine méthyle quaternisé avec du iodométhane (ANPQ), un trouble est observable à la stoechiométrie, rapport de charges égal à 1 (**Desbrieres et Rinaudo, 1981**). Ce trouble se disparaît avec l'ajout du polyélectrolyte titrant en excès.

III-1-2. Observations visuelles de la séparation de phase après cinq jours et étude de la composition des deux phases obtenues

Nous avons observé la séparation de phases après cinq jours dans des tubes contenant les mélanges gélatine/NaCMC/eau à concentration 1%, ainsi qu'à différents pH. Notre choix s'est porté sur pH 4,2 ; 6,8; 7,8 et 8,3. Ces observations visuelles ont été faites pour confirmer

réellement que l'interaction maximale entre les deux biopolymères a eu lieu effectivement à pH 4,2 avec séparation de phases.

L'examen visuel des tubes après cinq jours à pH 4,2, atteste la présence de deux phases dont les volumes varient en fonction du ratio Pr : Ps (**Figure III.5**), la phase inférieure s'agit d'un semi-solide blanchâtre, cette observation confirme celle de (**Wang *et al.*, et 1999**) qui précisent que lorsque l'interaction électrostatique est faible, la séparation de phase est de type liquide-liquide, alors qu'elle est plutôt de type liquide-solide si les interactions sont fortes.

L'influence du ratio Pr : Ps a également été mise en évidence. Globalement, le volume de la phase inférieure est maximal pour le ratio 1 : 1 (**Figure III.5**). Ces résultats sont en accord avec les résultats de la variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm. Nous avons vu que pour pH 4,2, l'absorbance est plus importante dans la gamme de ratio comprise entre 8 : 1 et 1 : 8. On remarque aussi que ces mélanges sont également caractérisés par un trouble persistant de la phase supérieure après cinq jours. Ceci indique la présence de particules solubles pour lesquelles les charges des deux biopolymères ne sont pas totalement neutralisées ou on est à la présence de particules de petite taille.

1 : 8 1 : 4 1 : 2 1 : 1 2 : 1 4 : 1 8 : 1

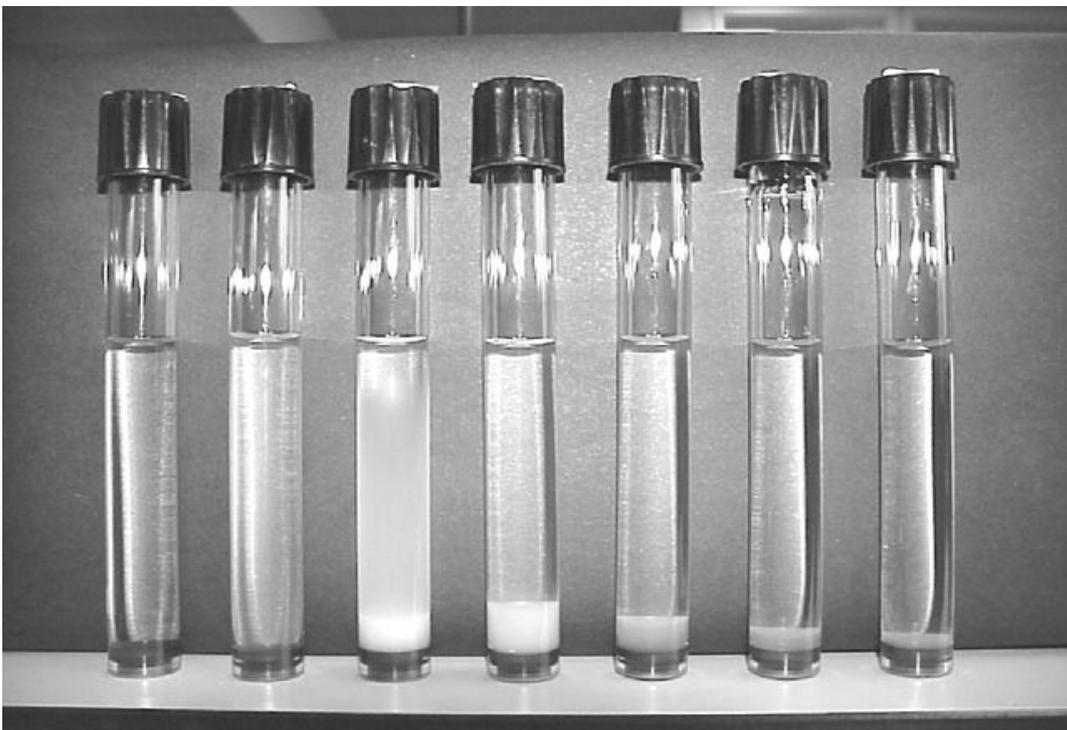


Figure III.5: Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps du mélange gélatine/ Na CMC/eau à 1%, après 5 jours à pH 4,2.

Pour les mélanges à pH 6,8, 7,8 et 8,3 (**Figure III.6a-c**), ils se retrouvent donc clairs du fait de la solubilité des particules formées ou de la diminution de leur taille. L'explication de ce phénomène réside dans la diminution du nombre de charges positives portées par les molécules de gélatine au fur et à mesure que l'on augmente le pH. Les tubes précédemment troubles se retrouvent donc clairs du fait de la solubilité des particules formées. Ces résultats sont en accord avec les mesures d'absorbance des mélanges à 650 nm. Concernant toujours les mélanges à pH 6,8, 7,8 et 8,3, on remarque que le volume de la phase inférieure obtenue est très faible (**Figures III.6a-c**). La phase supérieure est transparente à tous les ratios Pr : Ps, indiquant une neutralisation partielle des charges des deux macromolécules (complexes macromoléculaires solubles) ou une faible interaction entre les deux biopolymères.

III-1-3. Etude de l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration et du pH du système natif

Les valeurs de l'absorbance obtenues pour les solutions G/NaCMC sont dépendantes du pH des solutions et sont moins élevées à pH neutre qu'à pH acide (près de pIE) (**Figures III.7-9**). En plus, l'augmentation de la concentration en protéines a généralement pour effet d'augmenter l'absorbance (**Schmitt et al., 1999**). Cette augmentation est plus remarquable à pH 4,2.

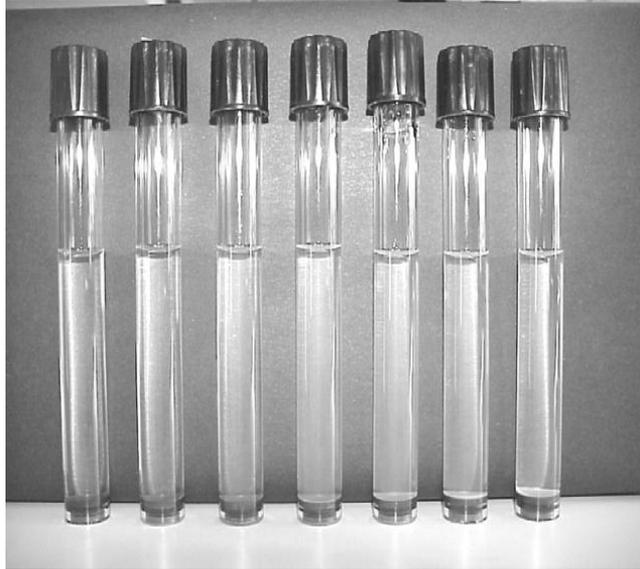
Cependant, l'ajout de la carboxyméthylcellulose (NaCMC) a pour effet d'augmenter l'absorbance surtout à pH 4,2 et 5,2 (**Figures III.7-8**).

La présence de la NaCMC seule ou de la NaCMC et du NaCl simultanément en solution, influence les valeurs de l'absorbance. Toutefois, les valeurs de l'absorbance lors de l'ajout simultané de la NaCMC et de NaCl à différentes concentrations sont moins importantes que celles observées lors de l'ajout de la NaCMC seule (**Figures III.7-9**).

L'effet de la NaCMC semble prédominer sur celui de NaCl car l'ajout de quantités de plus en plus grandes de NaCMC provoque une augmentation de plus en plus importante de l'absorbance à pH 4,2 (**Figure III.7**). Cela est dû aux fortes concentrations salines, puisqu'on sait bien qu'en présence de concentrations ioniques relativement faibles la formation de complexes de biopolymères est favorisée, parce que le nombre de charges sur ces molécules est suffisant pour effectuer des liens électrostatiques entre elles sans être significativement influencés par les ions.

(a)

1:8 1:4 1:2 1:1 2:1 4:1 8:1



(b)

1:8 1:4 1:2 1:1 2:1 4:1 8:1



(c)

1:8 1:4 1:2 1:1 2:1 4:1 8:1



Figure III.6: Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps de mélange gélatine/ Na CMC/eau à 1%, après 5 jours à pH (a) 6,8, (b) 7,8 et (c) 8,3.

Par contre à de fortes concentrations en ions, il y a un effet inverse, celui de la suppression des complexes, qui se justifierait par l'entrée en compétition des ions, avec les macromolécules. Cela veut dire en réalité qu'à forte concentration en ions dans la solution, les charges portées par les biopolymères sont réduites par les interactions avec ces ions (en créant un effet d'écran électrostatique), ce qui empêcherait les interactions électrostatiques entre les molécules de protéine et de polysaccharide (**Mattison *et al.*, 1995**), pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe comme cela a été prédit par la théorie de (**Veis et Aranyi, 1960**). Lors de l'étude de la coacervation complexe établie entre la myoglobine et des polysaccharides anioniques, (**Imeson *et al.*, 1977**) ont montré aussi que l'augmentation de la force ionique entraînait une perte de l'action protectrice du polysaccharide pour la protéine qui était alors dénaturée après traitement thermique.

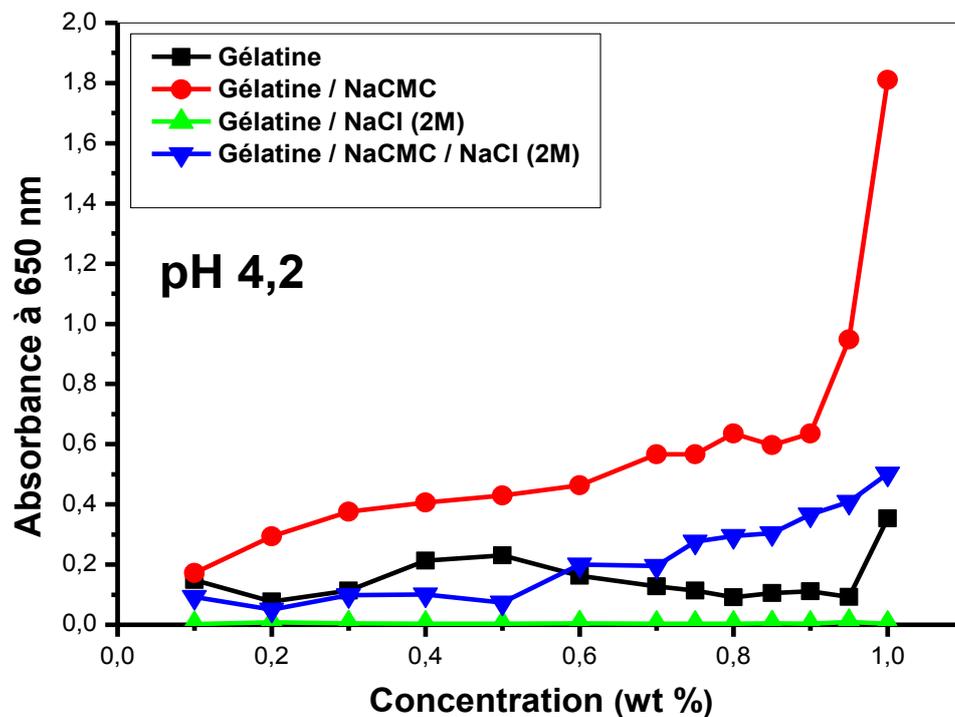


Figure III.7 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 4,2.

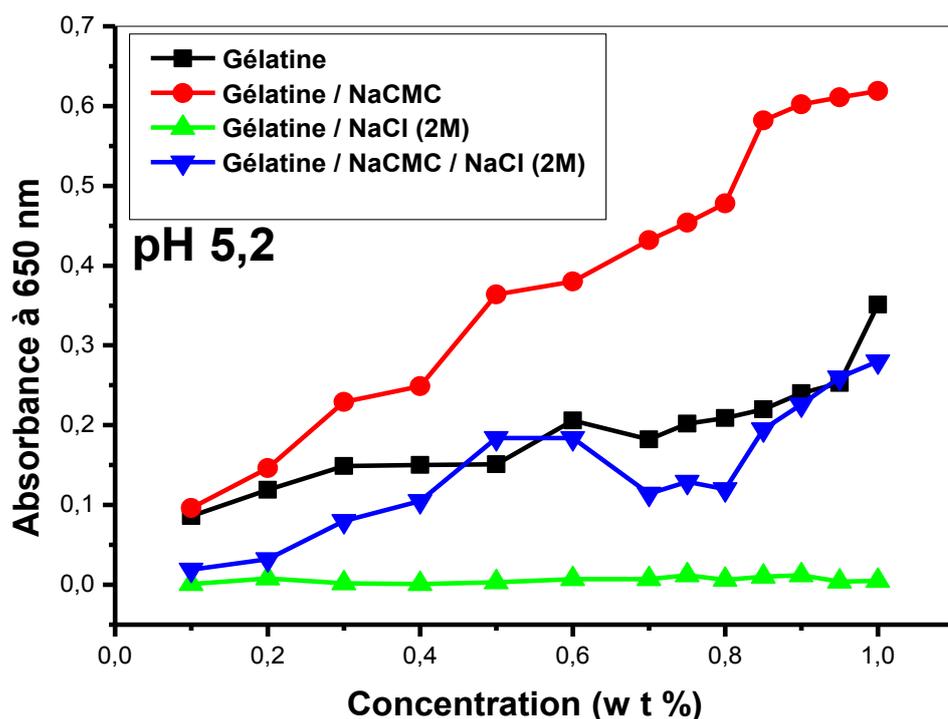


Figure III.8: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 5,2.

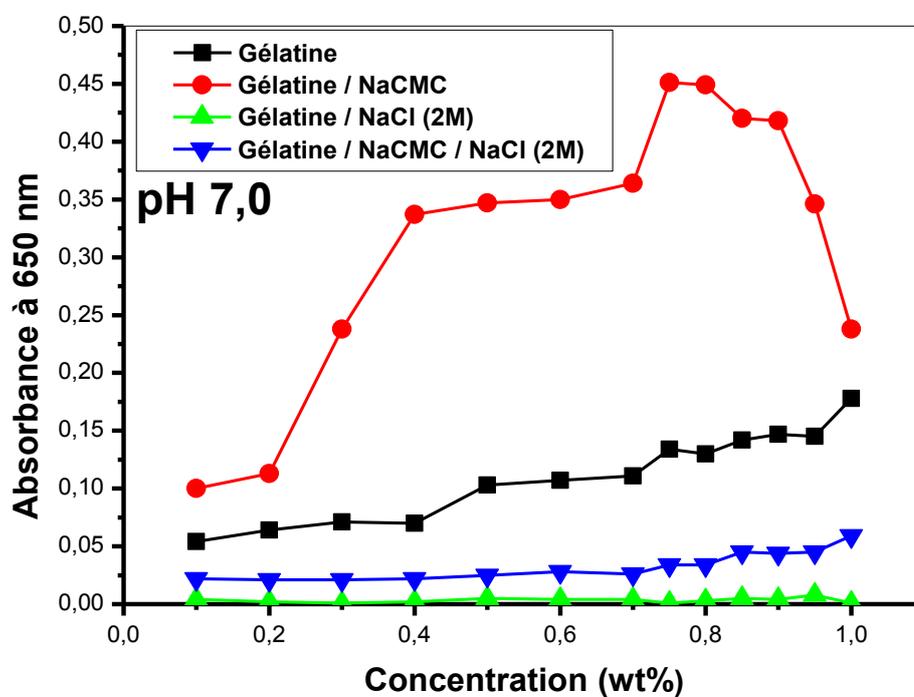


Figure III.9 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de NaCl (2 M) à pH 7,0.

Les **figures III.10-12** présentent les variations de l'absorbance de la solution de gélatine à différentes concentrations et à différents pH, en absence et en présence de CaCl₂. Les résultats montrent que la présence de CaCl₂ en solution diminue l'absorbance de la gélatine plus particulièrement à pH 4,2 et 5,2 en comparaison avec celles obtenues pour la gélatine seule. Par contre, elle augmente à pH 7,0.

L'ajout de la NaCMC a pour effet aussi d'augmenter l'absorbance, surtout à pH 4, 2. D'autre part l'addition de la NaCMC et du CaCl₂ respectivement en solution influence les valeurs de l'absorbance. Toutefois, les valeurs de l'absorbance lors de l'ajout de la NaCMC et du CaCl₂ sont moins importantes que celles observées lors de l'ajout de la NaCMC seule à l'exception de pH 7,0. Ces interprétations ont été aussi émises et confirmées par (**Mattison *et al.*, 1995**) et par (**Schmitt *et al.*, 2000**) qui ont pu montrer que les ions divalents supprimaient la coacervation complexe à des concentrations ioniques plus faibles que les ions monovalents, mais que cette suppression pouvait être levée si la solution des ions divalents était diluée. Ceci démontrerait que l'effet ionique des ions divalents est plus fort que celui des ions monovalents. Mais cela ne va pas empêcher de dire que l'effet de la NaCMC reste toujours prédominant sur celui de CaCl₂ et de NaCl suite aux observations faites.

À travers les différentes valeurs d'absorbance obtenues, nous avons pu constater que l'ajout de concentrations croissantes en NaCl et CaCl₂ se traduisait par des changements de structure des solutions de la gélatine. Ces changements apparaissent cependant pour des gammes de concentrations en CaCl₂ beaucoup plus faibles qu'en NaCl. Les différences observées par l'effet des ions Na⁺ et Ca²⁺ sur la structure des solutions ne peuvent pas être expliquées uniquement par la valence des ions. La nature des interactions existantes entre la gélatine et ces deux cations semble différente. Bien que tous les deux diminuent les répulsions de la protéine, il semble que des liaisons spécifiques avec la gélatine auraient lieu en présence d'ions Ca²⁺ (**Donato, 2004**).

Dans des travaux précédents réalisés par (**Renard et Thibault, 1993**); (**Walkinshaw et Arnott, 1981**), ont pu aussi montrer qu'en présence d'ions divalents, les chaînes de la protéine s'organisent en deux dimensions présentant des groupements carboxyliques chargés négativement entre lesquels les ions viennent se loger. Le gel rigide de gélatine ainsi obtenu est le résultat d'interactions entre les groupements carboxyles libres et les ions (calcium), formant des ponts entre les molécules. Ce modèle est connu sous le nom de «egg-box» ou boîte d'oeufs.

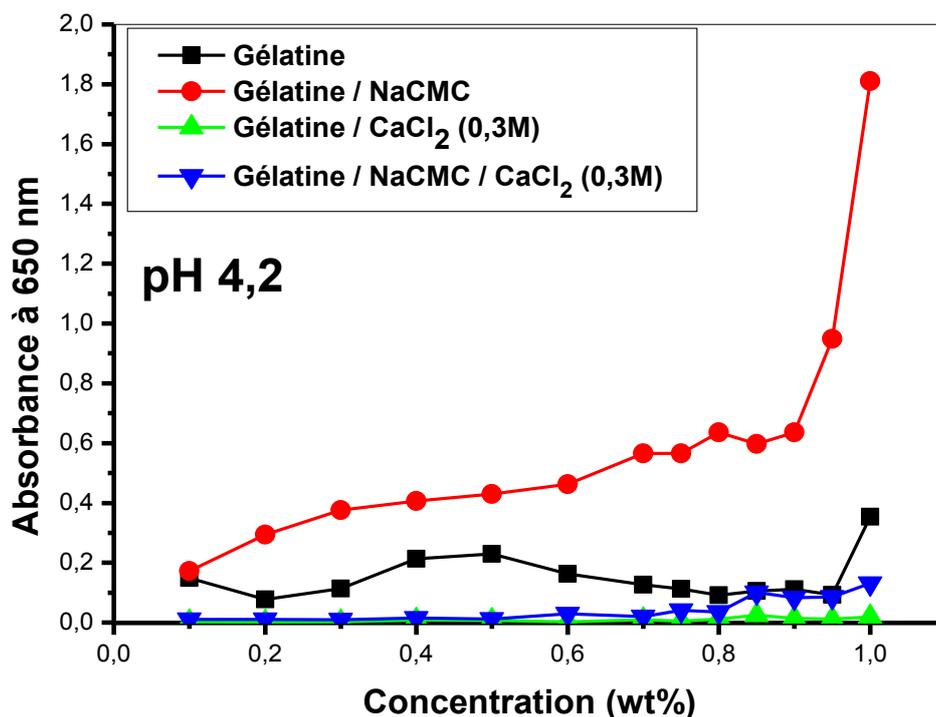


Figure III.10 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0,3 M) à pH 4,2.

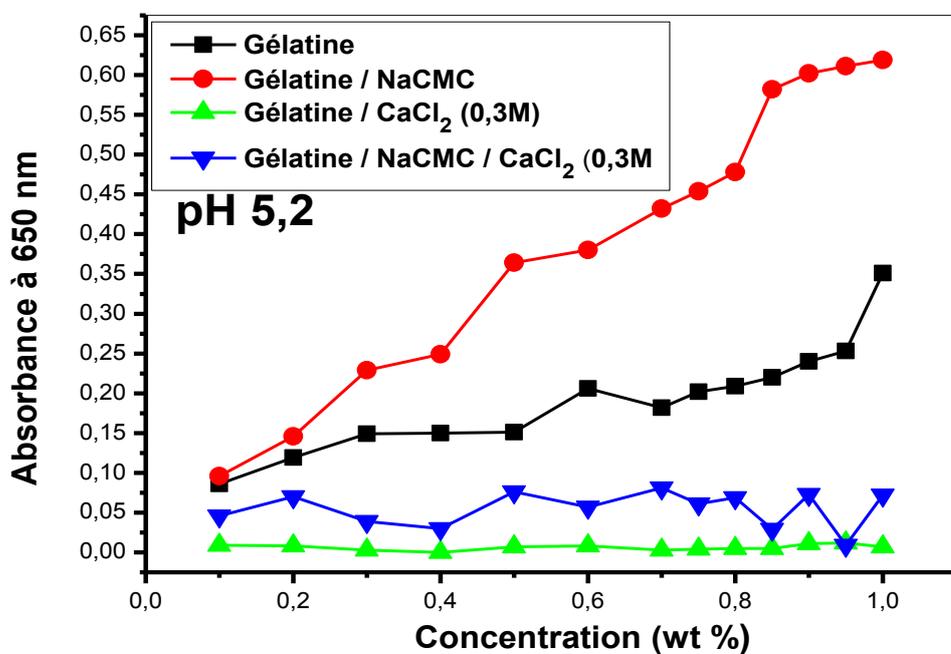


Figure III.11 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0,3 M) à pH 5,2.

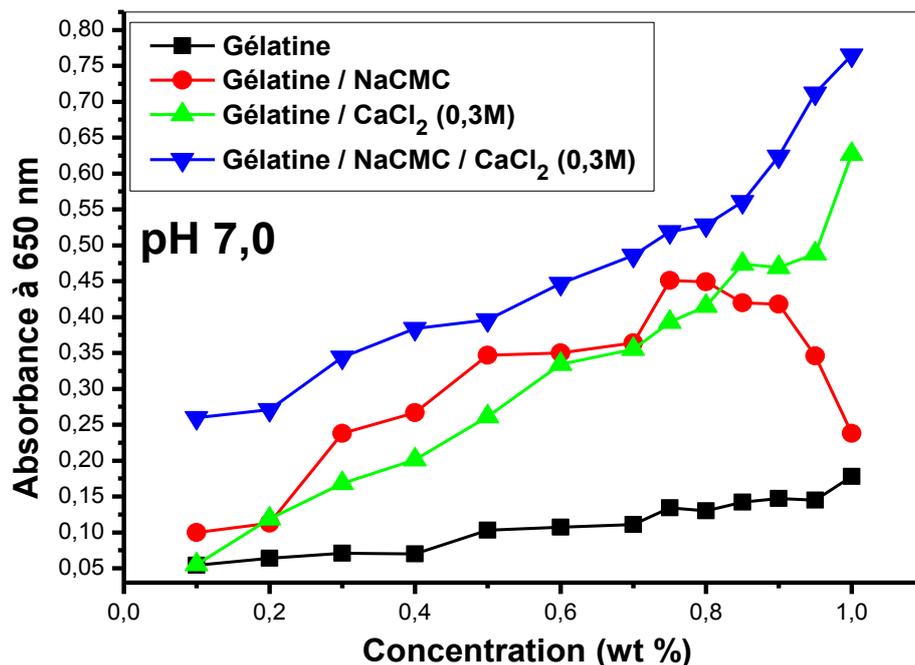


Figure III.12 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence de CaCl₂ (0,3 M) à pH 7,0.

Par ailleurs, des études de la cinétique d'hydrolyse de la protéine par la thermolysine ont mis en évidence que la fixation du calcium induisait des changements de conformation de la protéine (Dufour *et al.*, 1994). Ceci a également été mis en évidence dans les travaux de Jeyarajah et Allen (Jeyarajah et Allen, 1994), qui ont montré que la réactivité des groupes sulfhydryles de la β -Lactoglobuline s'accroît quand la teneur en calcium de augmente (dans la gamme 1-15 mM, pH 8). Ce résultat serait probablement lié à la formation ponts intramoléculaires entre les groupes chargés de la protéine et le calcium, induisant de petits changements de conformation. En outre, l'hydrophobie augmentant parallèlement, la présence de calcium favoriserait celle-ci et la formation de ponts disulfures. Le chlorure de sodium n'aurait en revanche aucun effet sur la réactivité du groupe sulfhydryle.

Maintenant passant à l'étude de l'effet des sucres, qui sont souvent inclus dans la formulation des médicaments et des produits alimentaires tels que le glucose, le saccharose, le lactose et les polyols, qui peuvent avoir un effet protecteur sur diverses protéines contre la dénaturation thermique qui survient lors des différents processus de transformation surtout dans le domaine alimentaire.

Dans ce même contexte, la **figure III.13** présente les variations de l'absorbance de la solution de gélatine à différentes concentrations et à différents pH en présence et en absence du glucose. Les résultats montrent que la présence du glucose en solution diminue l'absorbance de la gélatine surtout à pH 4,2 semblablement au cas de CaCl_2 .

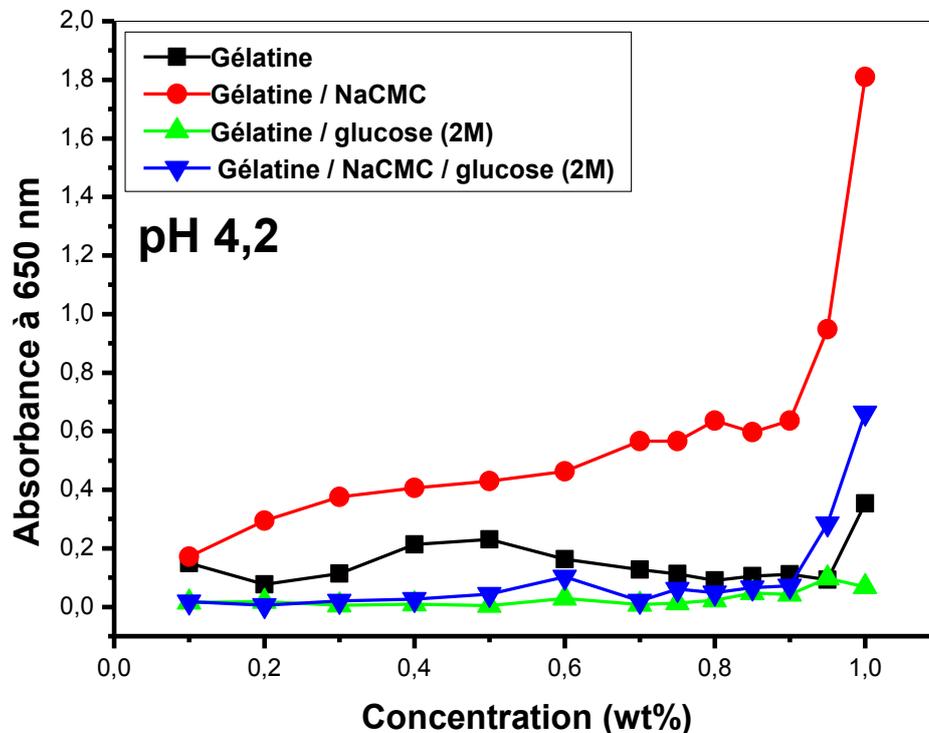


Figure III.13 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH4,2.

Par contre, à pH 5,2 et 7,0 l'absorbance augmente avec l'ajout de glucose qui peut s'expliquer par une plus grande organisation des molécules d'eau autour des molécules de protéines qui maintient ou même accentue leur hydratation. Cette structure protège les protéines contre la dénaturation thermique, ralentit leur déploiement et leur tendance à l'agrégation (**Bull, 1978**).

Ceci a été effectivement observé dans les travaux réalisés par **Morr et Ha (Morr et Ha, 1993)**, qui ont confirmés que les sucres sont des substances qui stabilisent la structure native des protéines contre la dénaturation par la chaleur et la congélation, et donc elles pouvaient avoir un effet protecteur sur la structure des protéines (**Morr et Ha, 1993**) d'une part.

D'autre part, **Bernal *et al.*, (Bernal *et al.*, 1985)**, ainsi que **Boye *et al.*, (Boye *et al.*, 1996)** ont aussi démontré cet effet protecteur sur la protéine lors de l'ajout de différents sucres tels que le (le glucose, le lactose ou le sucrose).

D'un autre coté, l'addition de la NaCMC augmente l'absorbance. Cet effet est plus remarquable à pH 4,2. Toutefois, les valeurs de l'absorbance lors de l'ajout simultané de la NaCMC et du glucose restent moins importantes que celles observées lors de l'ajout de la NaCMC seule (**Figures III.13-15**).

On peut conclure à nouveau que l'effet de la NaCMC semble prédominer sur celui de NaCl, CaCl₂ et du glucose dans tous les cas étudiés.

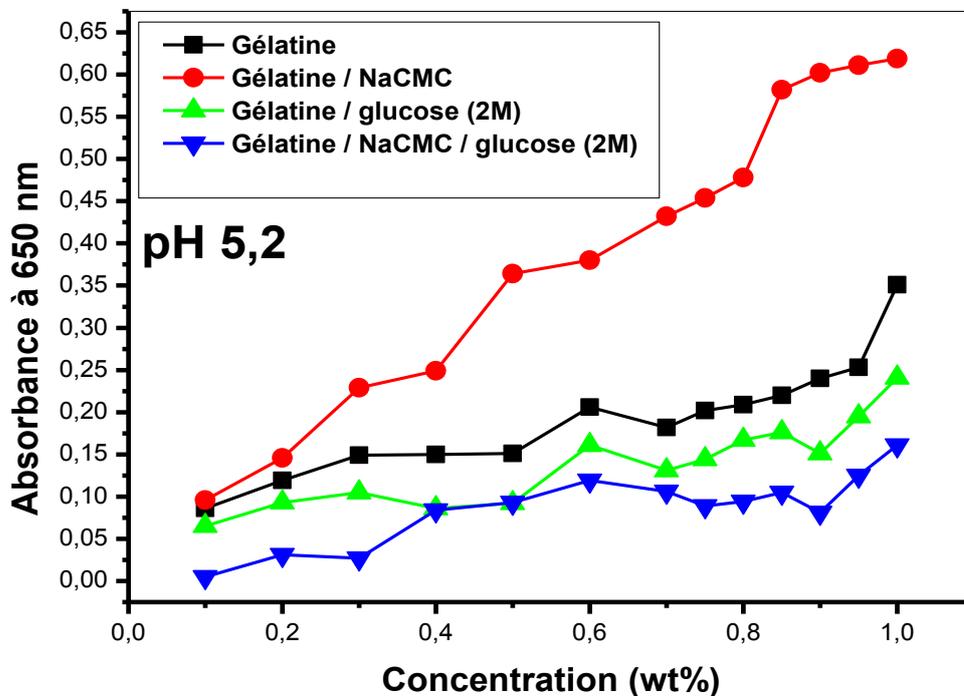


Figure III.14 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH 5,2.

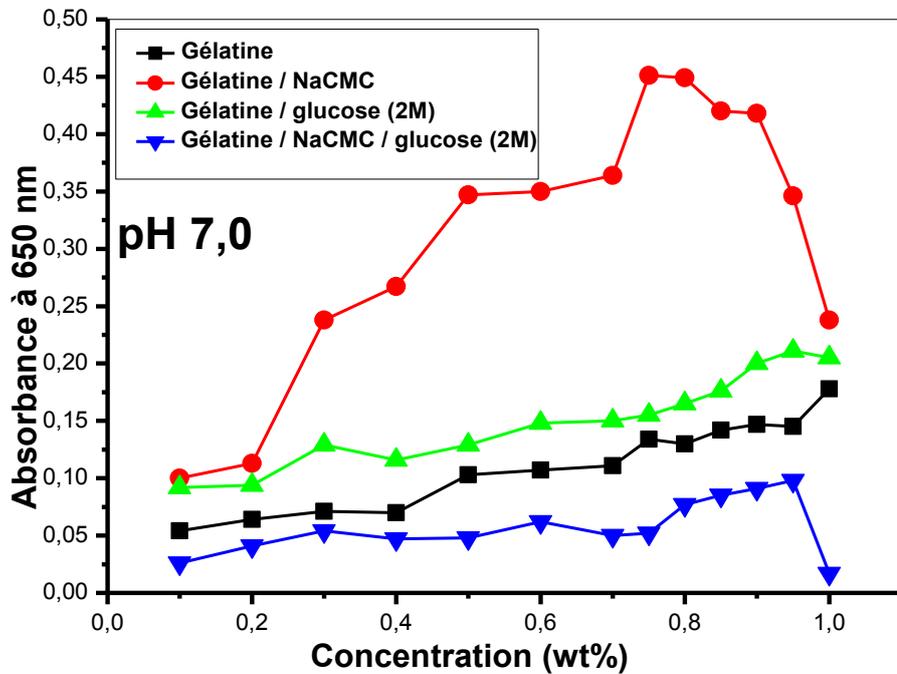


Figure III.15 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de la gélatine, et du mélange gélatine/ NaCMC (1 : 1), en absence et en présence du glucose à pH 7,0.

III-1-4. Diagrammes de phase

L'élaboration des diagrammes de phases permet d'étudier le comportement en solution de mélanges de polymères. Le comportement de différents systèmes G/NaCMC en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose a donc été observé visuellement et caractérisé comme étant compatible ou incompatible selon les différentes concentrations de la gélatine et de la NaCMC ainsi que les pH des solutions.

Une observation des tubes est ensuite réalisée. Cette première observation permet de définir le diagramme d'état en distinguant les systèmes qui présentent une séparation de phase macroscopique de ceux qui restent homogènes. Le nombre de phases du système a été évalué selon que la séparation de phases était évidente ou non. Puisque les solutions de gélatine seule et de NaCMC seule sont toutes les deux claires, la présence de turbidité est causée par des interactions entre les protéines et les polysaccharides du système (Michon *et al.*, 1996).

III-1-4-1. Système Gélatine/NaCMC

Les solutions Gélatine/NaCMC à pH 4,2 se sont révélées claires et homogènes pour les concentrations inférieures à 0,6%. Il est possible que le seuil de concentration critique où une séparation de phase n'est survenue qu'à une concentration supérieure à 0,6% et qui est plus

remarquable surtout à 0,95% (**Figure III.16, voir annexe A1**). Ceci concorde effectivement avec les résultats trouvés pour la variation de l'absorbance, car à cette concentration on a un maximum d'interaction entre les deux biopolymères.

Par contre, il a été observé tant à pH 5,2 qu'à pH 7,0 une turbidité avec précipitation pour les mélanges G/NaCMC et à toutes les concentrations d'une manière générale (**Figure III.16, voir annexe A1**).

C'est par une augmentation de la turbidité et non par une séparation en deux phases distinctes que celle-ci s'est manifestée. Cette augmentation de turbidité correspond aussi à une séparation de phases. D'après **Syrbe et al.**, (**Syrbe et al., 1995**), lorsque les phases d'une solution de polymères incompatibles sont soumises à une agitation, celles-ci se comportent comme de l'huile et de l'eau, c'est-à-dire qu'elles forment une émulsion instable. Selon **Michon et al.** (**Michon et al., 2000**), il est possible que la turbidité des mélanges s'explique partiellement par une haute concentration en polymères qui provoque une augmentation de la viscosité des mélanges. Les phases macroscopiques de ces mélanges auraient alors de la difficulté à se séparer étant donné la présence de cette haute viscosité. Toutefois, après centrifugation, les mélanges demeurent toujours troubles ce qui indique que la viscosité n'est pas la seule responsable de la turbidité des mélanges (**Michon et al., 2000**). Un comportement semblable a été obtenu par (**Michon et al., 2000**) avec des mélanges gélatine iota-carraghénane à pH7,0. D'autres auteurs ont aussi observé que le comportement des systèmes contenant des protéines du lactosérum prétraitées en présence de polysaccharides anioniques, telle la K-carraghénane à pH 7,0 s'est manifesté par une séparation de phases et non par augmentation de la turbidité (**Syrbe et al., 1995**).

L'apparition de cette séparation de phases ou bien cette turbidité, s'explique aussi par le fait que la majorité voire la totalité des polysaccharides se retrouve dans la phase supérieure de la solution avec une grande partie du solvant, alors que les protéines concentrées se retrouvent dans la phase inférieure avec très peu de solvant. Ceci est premièrement dû au fait qu'à ce pH surtout (à pH 5,2), les protéines sont proches de leur pI et ne sont pas chargées, elles interagissent beaucoup plus entre elles qu'avec les autres constituants de la solution. Deuxièmement la NaCMC a la particularité d'exclure les autres polymères de son milieu et s'accaparer la majorité du solvant grâce à sa structure particulièrement hydrophile (**Syrbe 1997**).

En présence de sel et surtout à pH 4,2 les mélanges montrent des solutions claires (**Figure III.17, voir annexe A1**), sans particules en solution et sans précipitation pour des

concentrations inférieures à 0,6%, c'est-à-dire on aura suppression de la coacervation qui se manifeste par la disparition totale de la séparation de phases.

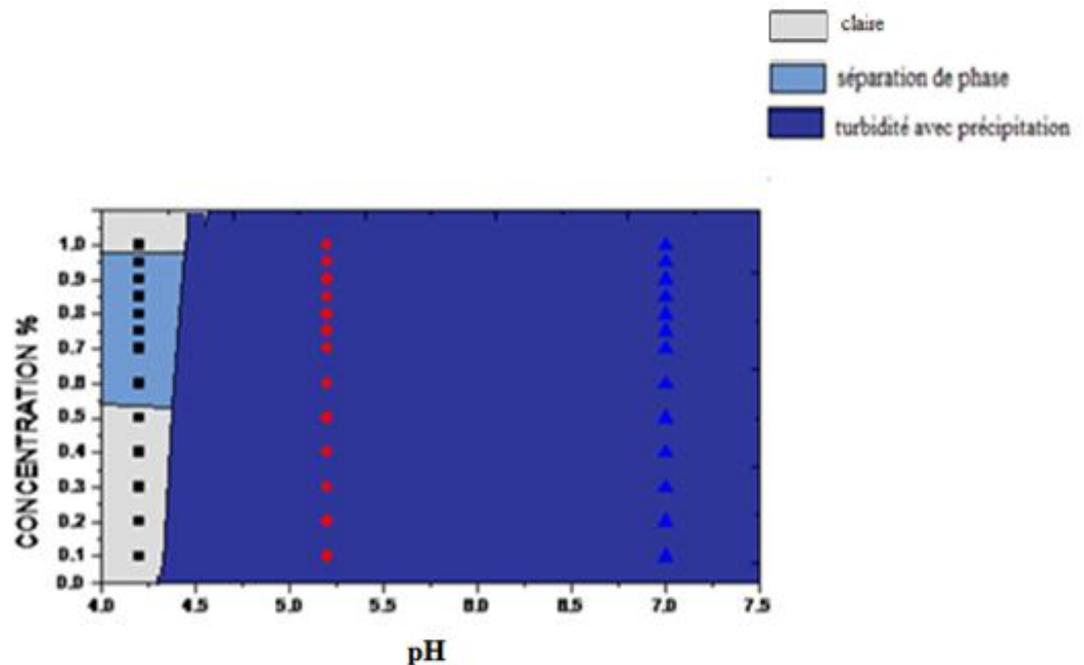


Figure III.16 : Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en fonction de la concentration et du pH.

La raison pour laquelle il n'y a pas de séparation de phases car à de fortes concentrations en ions, il y a un effet inverse, celui de la suppression des complexes, qui se justifierait par l'entrée en compétition des ions, avec les macromolécules. Cela veut dire en réalité qu'à forte concentration en ions dans la solution, les charges portées par les biopolymères sont réduites par les interactions avec ces ions (en créant un effet d'écran électrostatique), ce qui empêcherait les interactions électrostatiques entre les molécules de protéines et de polysaccharides (Mattison *et al.* 1995), pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe comme cela a été prédit par la théorie de Veis et Aranyi (Veis et Aranyi 1960).

Mais, pour des concentrations supérieures à 0,6% en présence de NaCl à pH 4,2 et pour toutes les concentrations d'une manière générale à pH 5,2, les solutions sont turbides avec

précipitation. Cette augmentation de turbidité correspond aussi à une séparation de phases. La présence de force ionique élevée minimise les interactions électrostatiques entre les groupements chargés des protéines et des polysaccharides et favorise les interactions polymère-polymère de même nature (**Tolstoguzov, 1991**). Les interactions polysaccharides - solvant et protéines-solvant diminuent donc en faveur des interactions polysaccharides-polysaccharides et protéine-protéine, ce qui entraîne cette séparation de phases.

Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs qui ont observé que les mélanges protéines-polysaccharides anioniques ne montraient pas de séparation de phases, à moins d'être en présence d'une force ionique élevée (plus de 0,2M de NaCl) ce qui est notre cas (**Antonov et al., 1979; Tolstoguzov, 1991**).

Par contre, la précipitation qui est plus apparente surtout à pH 5,2, est dûe à la grande force ionique présente : l'eau étant devenue un moins bon solvant, les interactions protéines-protéines augmentent et une partie de celles-ci devient insoluble surtout aux pH près du pI où les interactions protéines-protéines sont déjà favorisées (**Grinberg et Tolostoguzov, 1997**).

À pH 7,0, les mélanges se sont tous révélés clairs et homogènes. La zone d'homogénéité de ce système correspond aux conditions découlant d'une diminution de l'absorbance, c'est-à-dire à des concentrations élevées en polymère et une grande force ionique (**Figure III.17, voir annexe A1**). Il semble que l'augmentation des interactions protéines-protéines favorise la dénaturation puisqu'il se produit un effet de concentration des protéines amenant une augmentation des interactions hydrophobes et une absorbance plus faible (**Schmitt et al., 1999**). De plus, il est possible que l'augmentation des interactions polysaccharides-polysaccharides diminue ou empêche la formation d'une structure stabilisatrice avec l'eau. Ainsi la NaCMC ne contribue plus à la protection des molécules de protéines. Ceci pourrait expliquer la faible augmentation de l'absorbance en présence de grande quantité de polysaccharide.

En présence de CaCl_2 et aux trois pH étudiés, la totalité des solutions précipitent (**Figure III.18, voir annexe A1**). Cette précipitation a une tendance beaucoup plus vers une gélification surtout à pH7,0. Cela est dû probablement à la grande force ionique de CaCl_2 présente du fait que l'effet ionique des ions divalents est plus fort que celui des ions monovalents. L'eau étant devenue un moins bon solvant, les interactions protéines-protéines augmentent et une partie de celles-ci deviennent insolubles (**Tolostoguzov, 1997**). Cette précipitation qui est très apparente (gélification) se traduit par l'augmentation des valeurs de l'absorbance. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par **Walkinshaw et Arnott**

(Walkinshaw et Arnott, 1981) Renard et Thibault, (Renard et Thibault, 1993) qui ont pu aussi montrer qu'en présence d'ions divalents, on a formation d'un gel rigide qui est le résultat d'interactions entre les groupements carboxyles libres de la protéine et les ions (calcium), formant des ponts entre les molécules.

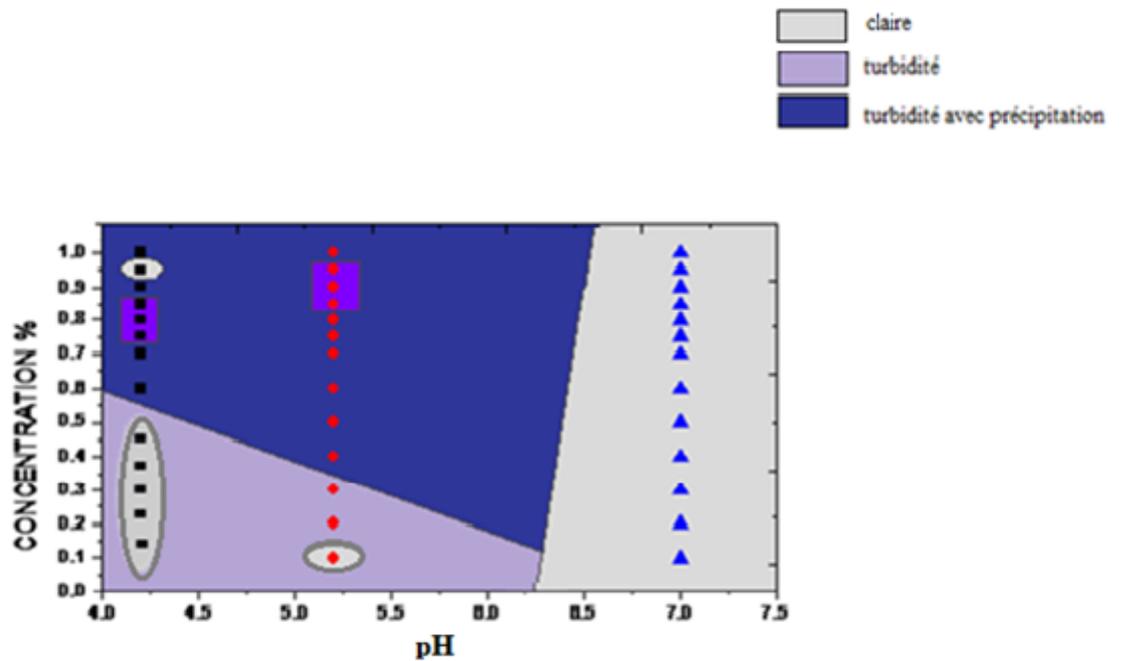


Figure III.17 : Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de NaCl (2M).

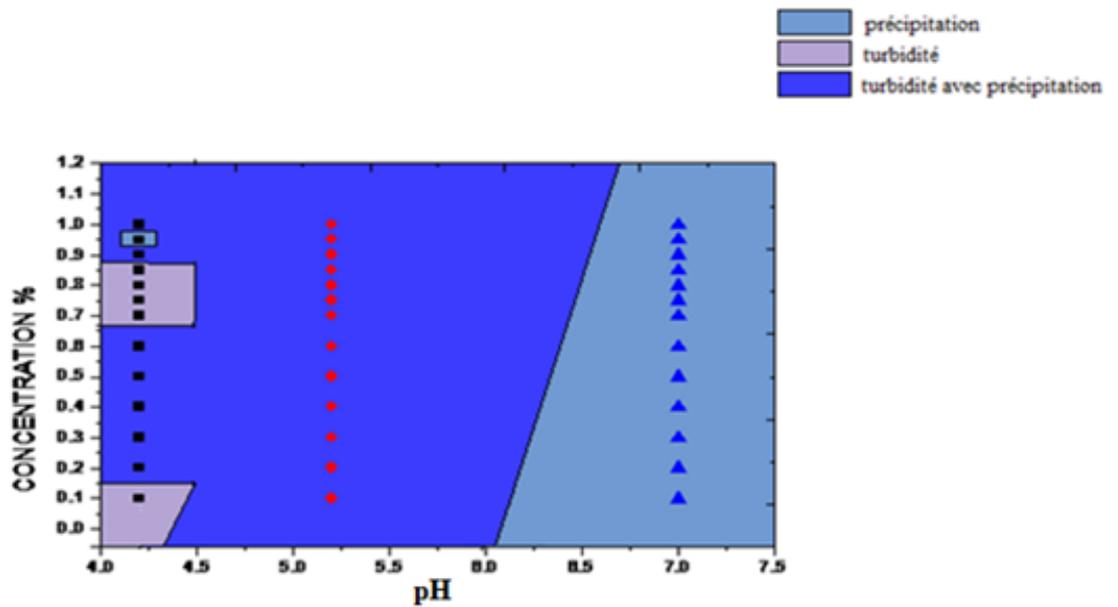


Figure III.18 : Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de CaCl_2 (0.3M).

Lors de l'ajout du glucose à ce système, la séparation de phase se prononce beaucoup plus à pH 4,2 et, par conséquent, la présence du glucose va minimiser les interactions électrostatiques entre les groupements chargés des protéines et des polysaccharides tout en favorisant les interactions polymères-polymères de même nature. Les interactions polysaccharides-solvant et protéine-solvant diminuent donc en faveur des interactions polysaccharides- polysaccharides et protéines-protéines, ce qui entraîne cette séparation de phases (Pörtsch, 2011) (Figure III. 19, voir annexe A1).

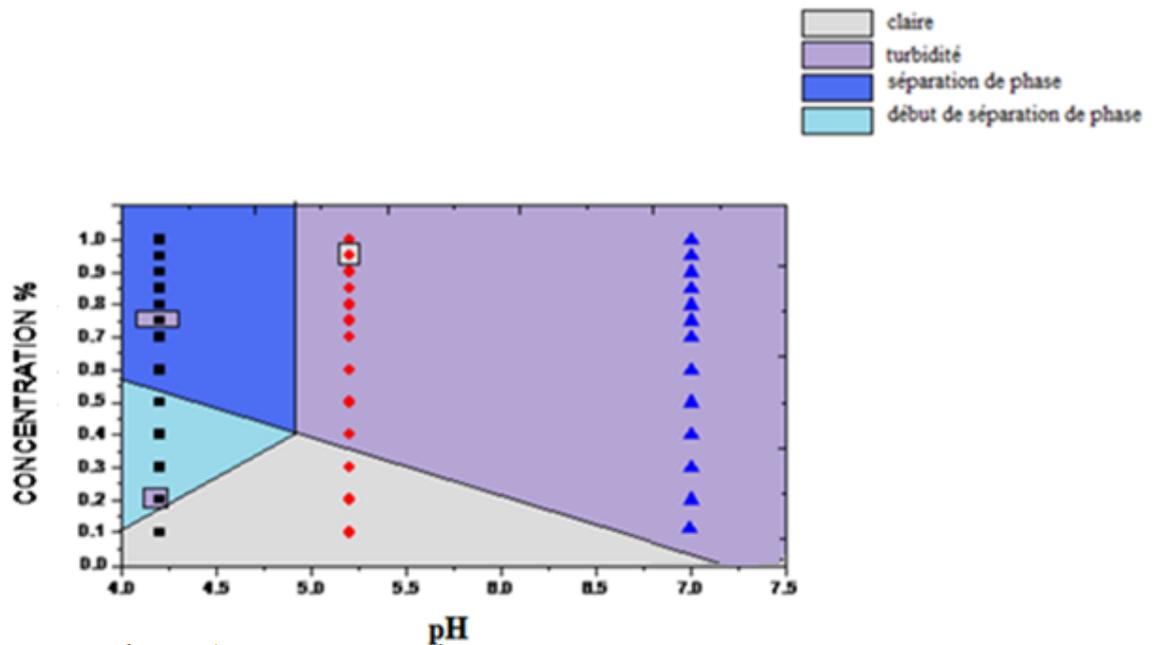


Figure III.19 : Diagramme de phase du système gélatine/NaCMC (1 : 1) en présence de glucose (2M).

III-1-5. Suivi de la mobilité électrophorétique obtenue dans le mélange gélatine/carboxyméthylcellulose

La mesure de la mobilité électrophorétique des colloïdes permet d'obtenir des informations quant à l'interaction entre la surface de ceux-ci et les molécules de solvant (Hunter, 1986, Hattori *et al.*, 2000) dans des conditions données de pH et de force ionique. La coacervation complexe étant majoritairement gouvernée par des interactions électrostatiques entre les macromolécules, la mesure de la mobilité électrophorétique doit nous permettre de définir les conditions optimales d'interaction entre les deux macromolécules en termes de pH.

Lorsqu'on suit l'évolution de la mobilité électrophorétique pour la dispersion gélatine/NaCMC/eau en absence de NaCl, on note une influence du ratio (Pr : Ps) sur l'allure des électrophérogrammes (Figure III.20). Lorsque le ratio (Pr : Ps) est bas (1 : 1) et (2 : 1), il est intéressant de noter que l'interaction entre la gélatine et la NaCMC n'a pas été affectée de façon remarquable et ceci en comparaison avec l'électrophérogramme de la gélatine seule.

Par contre, lorsque le ratio est en faveur de la protéine (8 : 1) et (4 : 1), leurs électrophérogrammes subissent des modifications importantes. Pour le ratio 8 : 1, le pic (1) a changé de forme en comparaison avec celui de la gélatine seule, par contre les pics (2) et (3) n'ont subi aucun changement d'une part. D'autre part, pour le ratio (4 : 1), les trois pics ont

changé de forme. Ceci concorde avec les résultats obtenus par UV-vis qui révèle que l'interaction maximale entre les biopolymères étudiés est obtenue pour ce même ratio pour une concentration totale en biopolymères 0,75 wt%.

Par contre, lorsqu'on suit l'évolution de la mobilité électrophorétique pour la dispersion gélatine/NaCMC/eau en présence de NaCl, on note aussi une influence du ratio (Pr : Ps) sur l'allure des électrophérogrammes, mais elle est moindre (**Figure III.21**). On peut dire que pour la dispersion gélatine/NaCMC/eau en présence de NaCl, et pour la totalité des ratios (Pr : Ps) ((1 : 1), (2 : 1), (4 : 1)), il est important de noter que l'interaction entre la gélatine et la NaCMC n'a pas été atteinte de façon remarquable en comparaison avec l'électrophérogramme de la gélatine seule. Cela veut dire en réalité qu'à forte concentration en ions dans la solution, les charges portées par les biopolymères sont réduites par les interactions avec les ions de Na⁺ (en créant un effet d'écran électrostatique), ce qui empêcherait l'établissement des interactions électrostatiques entre les molécules de protéines et de polysaccharides (**Mattison *et al.* 1995**), pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la complexation ; ceci est aussi en accord avec les résultats obtenus par UV-vis.

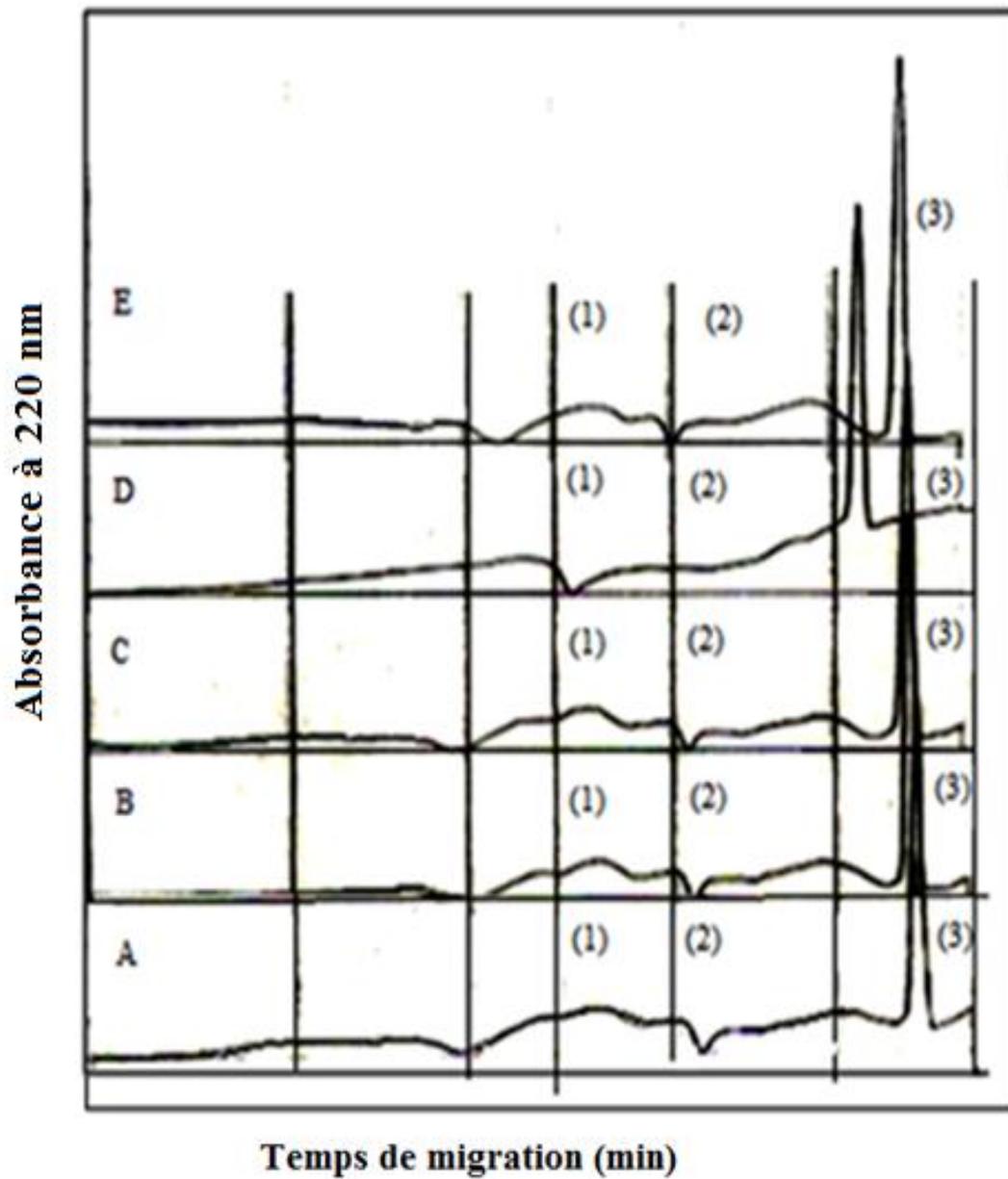


Figure III.20 : Électrophérogrammes de la gélatine seule (A) et des mélanges G/NaCMC à différents ratios : B (1 :1), C (2 :1), D (4 :1) E (8 :1) en absence de NaCl.

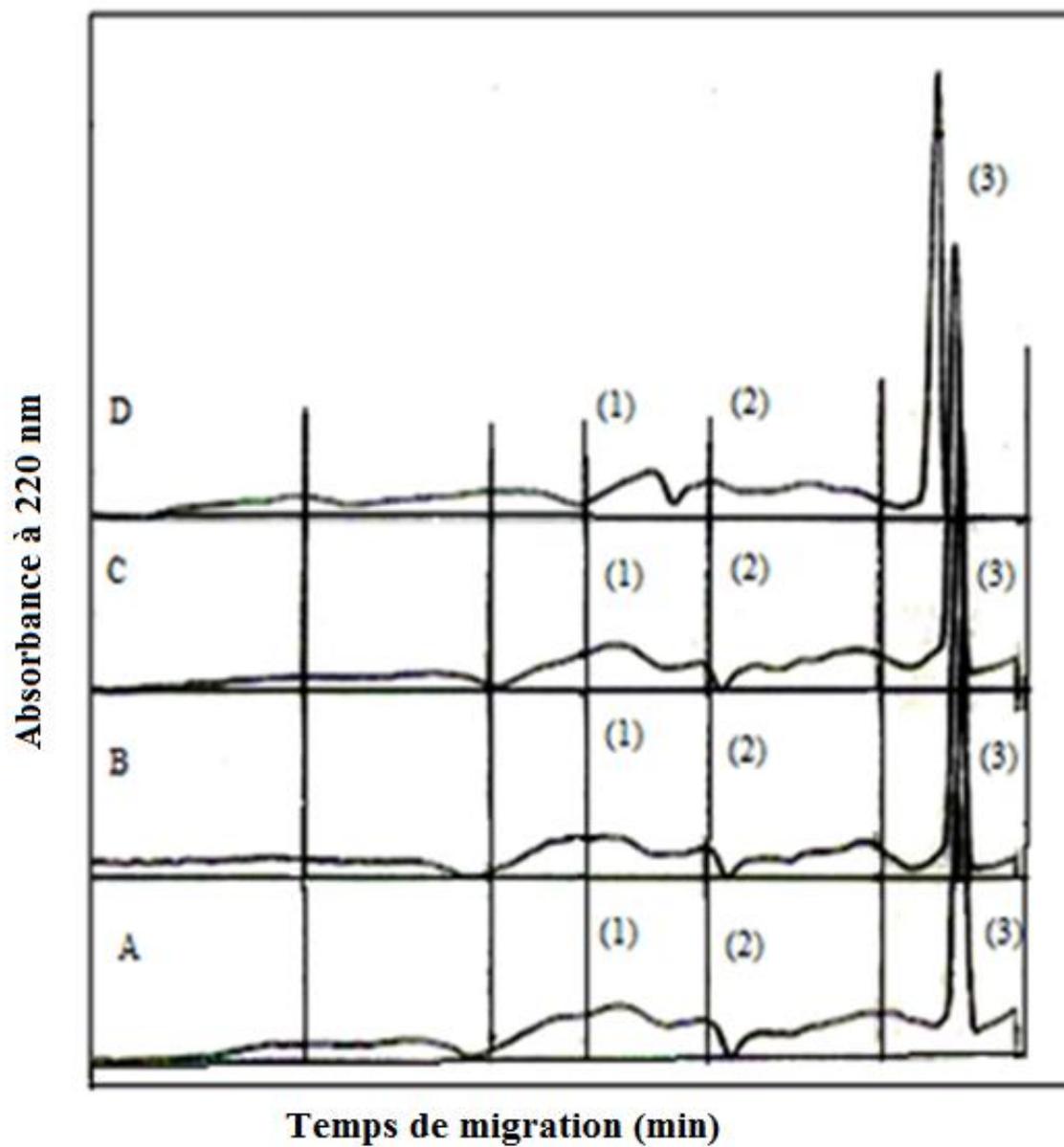


Figure III.21 : Électrophérogramme de la gélatine seule (A) et des mélanges G/NaCMC à différents ratios : B (1 :1), C (2 :1), D (4 :1) et en présence de NaCl.

III-1-6. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'une onde électromagnétique par un dipôle oscillant (groupement chimique). Les vibrations atomiques des molécules ont lieu dans le domaine infrarouge du spectre électromagnétique, mais la fréquence d'absorption dépend du type de liaison chimique et de son mode de vibration (**Lefèvre et Subirade, 2001**).

Les polysaccharides contenant des groupements carboxyliques comme la carboxyméthylcellulose peuvent également être étudiés par spectroscopie infrarouge. Dans ce cas, des variations de l'intensité des liaisons entre les atomes peuvent être mises en évidence en suivant la transmittance spécifique des groupements principaux (**Schmitt, 2000**).

La **figure III.22** montre le spectre infrarouge de la NaCMC :

Une large bande apparaît à 3333 cm^{-1} correspond aux variations de valence des OH. La bande à 905 cm^{-1} , correspond à la vibration spécifique des liaisons simples de type C-O-C qui compose les cycles des résidus glucidiques de la chaîne principale.

La bande à 1596 cm^{-1} est caractéristique de la vibration asymétrique des groupements carboxyliques (COO^-) portés par les résidus d'acide glucuronique.

Le spectre infrarouge de la NaCMC, affiche également une bande à 2907 cm^{-1} caractéristique des vibrations de valence C-H et correspond aux fractions aliphatiques (**Lii *et al.*, 2000**; **Szorcsik *et al.*, 2006**), tandis que les bandes caractéristiques à 1125 et 1052 cm^{-1} sont affectées à C-O-C des unités glucosidiques et β -(1 \rightarrow 4)-glucosidiques liées, respectivement (**Ma *et al.*, 2007** ; **Ren *et al.*, 2008**).

L'effet du pH sur la structure de la NaCMC est nettement visible sur les spectres IRTF, montre une modification significative de la position des bandes qui se situent à 905 , 1125 et 1052 cm^{-1} respectivement. En revanche, une augmentation de l'intensité de la bande située à 1596 cm^{-1} avec l'augmentation du pH de 6,83 à 7,0, révèle une déprotonation des groupements carboxyliques de la NaCMC (**Schmitt, 2000**).

De plus, le changement de pH de la solution de la NaCMC conduit à un déplacement bathochrome à pH 4,2 et 7,0 de 1596 cm^{-1} à 1629 cm^{-1} et 1605 cm^{-1} respectivement. Par contre, à pH 5,2 la bande ne subit aucun changement.

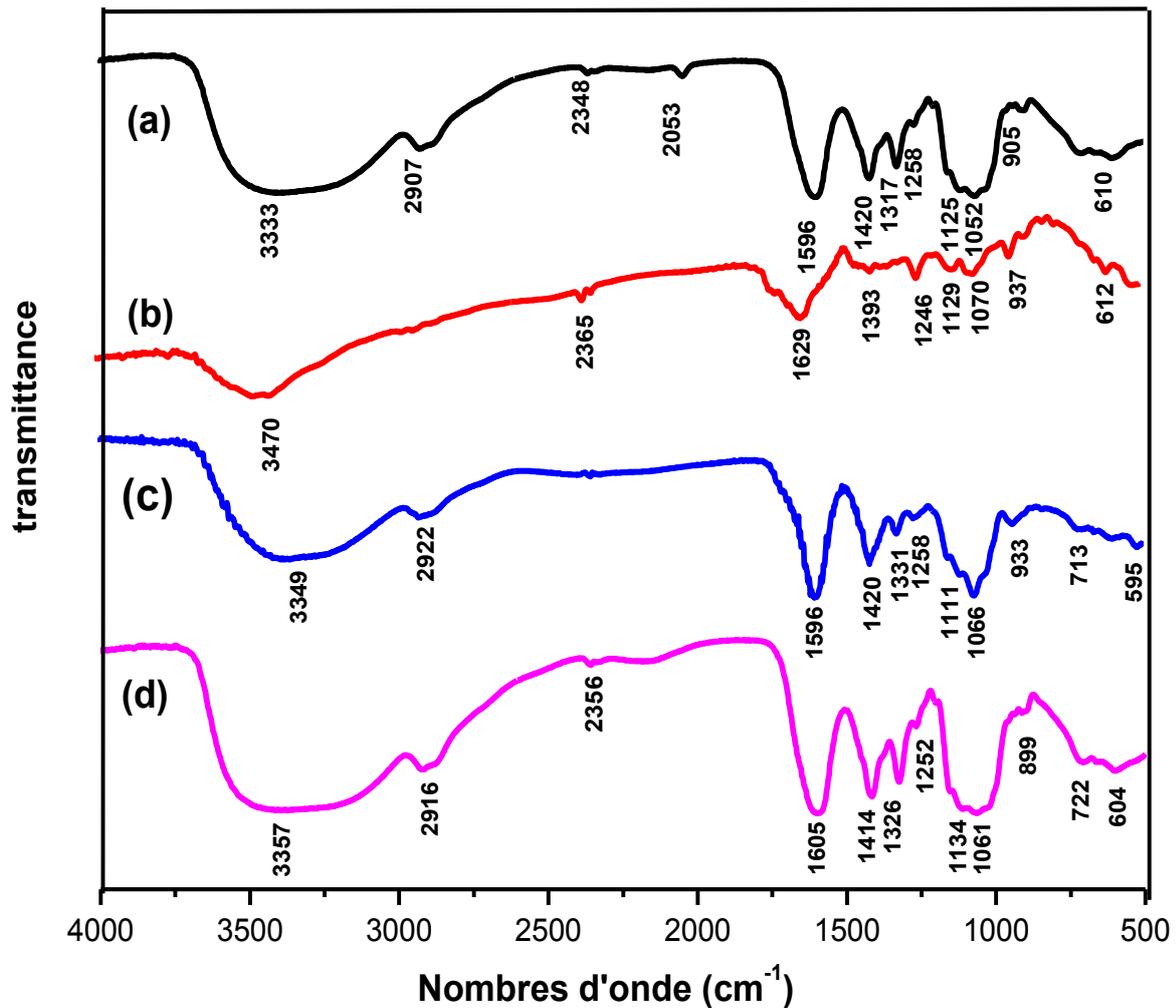


Figure III.22: Spectres infrarouge: (a) NaCMC native pH 6,83; (b) NaCMC pH 4,2 (c) NaCMC pH 5,2; (d) NaCMC pH 7,0.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est aussi sensible aux variations de structure secondaire des protéines impliquant les feuillets β , dont les plans des liaisons successifs sont disposés en zigzag et des angles voisins de 160° . Les chaînes latérales sont réparties alternativement de part et d'autre des plans. Les liaisons s'effectuent par pont hydrogène situés dans les plans du feuillet plissé entre des CO d'une liaison et des $-NH$ d'une autre liaison peptidique (Wilson, 1995).

Pour les protéines, le signal infrarouge est principalement dû aux vibrations des groupements amides de la chaîne polypeptidique, chaque groupement donnant lieu à des modes de vibration spécifiques. L'étude de la structure secondaire de la protéine est principalement basée sur l'intérêt porté à la vibration d'élongation de $C = O$ des groupements amides dans la région amide I du spectre, comprise entre 1600 et 1700 cm^{-1} (Casal *et al.*, 1988; Boye *et al.*, 1996; Lefèvre et Subirade, 2001). La spectroscopie infrarouge est très sensible à

l'arrangement spatial de ce type de liaison. Elle permet donc de distinguer une structure en hélices- α d'une structure en feuillets- β , qui est le type de structure secondaire pour laquelle cette méthode est la plus sensible (**Byler et Susi, 1986 ; Surewicz et Mantsch, 1988**).

La **figure III.23** illustre le spectre infrarouge de la gélatine native qui montre plusieurs bandes caractéristiques. La première région correspond aux vibrations de valence des OH et des NH qui apparaissent respectivement aux alentours de 3435 et 3326 cm^{-1} . La région qui s'étend entre (3600-2300 cm^{-1}) est l'amide A correspondant à l'élongation -NH couplée avec la liaison hydrogène (**Milch, 1964**).

Il existe aussi, selon (**Centeno et al., (2004)**), deux zones bien spécifiques :

Une première à environ 1655 cm^{-1} représente le carbonyle C=O de l'amide primaire (l'amide I). Une deuxième à 1554 cm^{-1} de l'amide II correspondant à l'élongation C-N et sa déformation dans le plan, d'une part et d'autre part, le pic à 1240 cm^{-1} correspond à l'amide III qui est attribuée aux vibrations des groupements C-N et N-H de l'amide liée ou bien aux vibrations des groupements CH_2 de la glycine (**Su et al., 2010 ; Guerrero et al., 2010**). Ces pics ont été identifiés comme étant similaires à ceux rapportés par (**Muyonga et al., 2004**).

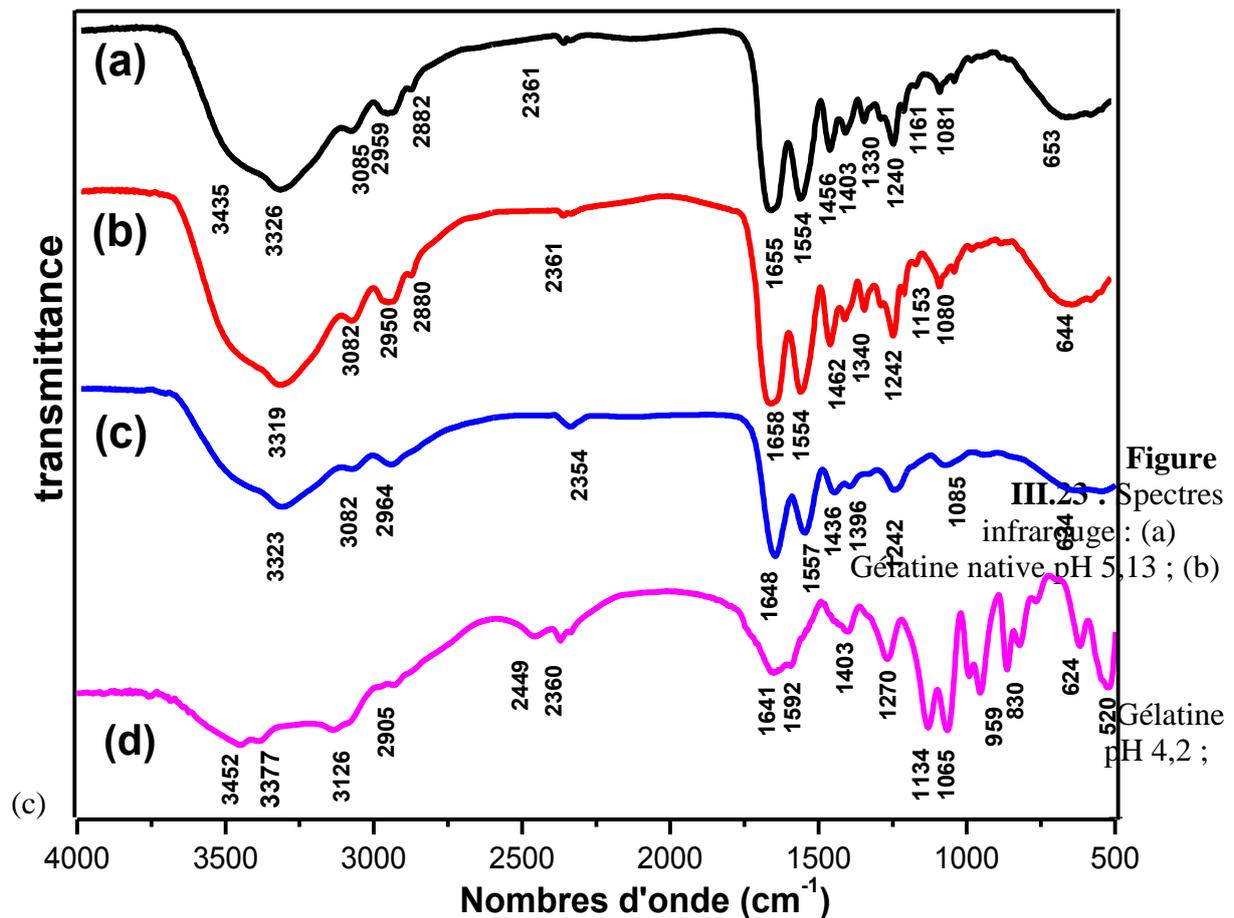
Selon une étude menée par (**Yakimet et al., 2005**), la triple hélice de la molécule mère qui est le collagène absorbe à 1660 cm^{-1} et l'hélice α s'étend en général de 1650 à 1640 cm^{-1} . Il a aussi été trouvé que lorsque le taux d'hélice augmente, il peut atteindre 1661 cm^{-1} , alors qu'en solution la gélatine perd son degré d'ordre qui est représenté par le taux en triple hélice. La bande d'absorption correspondante baissera jusqu'à 1643 cm^{-1} , alors que les feuillets- β se trouvent dans la gamme de 1640 à 1620 cm^{-1} , les β -tours absorbent à 1695 jusqu'à 1660 cm^{-1} . Par contre, la région de l'amide secondaire peut augmenter jusqu'à 1560 cm^{-1} et diminuer jusqu'à 1500 cm^{-1} . Cette dernière bande est moins sensible à la structure secondaire de l'amide I.

Il a été reporté par **Pal et al., (Pal et al., 2007)** que la vibration de déformation de N-H ou bien la vibration d'élongation et de déformation dans le plan de l'amide secondaire apparaît entre 1550 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} . L'apparition des deux bandes à 1655 cm^{-1} et 1554 cm^{-1} approuvent ce qui a été décrit dans la littérature (**Figure III.23**).

D'autre part, l'analyse de la région amide primaire du spectre de la gélatine fait apparaître une bande à 1655 cm^{-1} et une deuxième à 1554 cm^{-1} . Ces caractéristiques spectrales sont indicatives d'une structure secondaire composée principalement de feuillets β conjugués à la présence d'hélice α (**Dong et al., 1995; Bandekar et al., 1992**).

Nous décelons aussi deux épaulements d'intensités faibles à 2959 cm^{-1} et 2882 cm^{-1} correspondant aux C-H aliphatiques asymétriques et symétriques.

Par ailleurs, les vibrations de déformation de ces derniers groupements sont apparues à 1456 cm^{-1} et 1403 cm^{-1} .



Gélatine pH 5,2 ; (d) Gélatine pH 7,0.

Par contre, les bandes qui apparaissent à 1161 cm^{-1} et 1081 cm^{-1} correspondent à la vibration d'élongation C–O. La bande située à 653 cm^{-1} est due aux vibrations de balancement des NH.

Le suivi de l'influence du pH sur la structure en feuillets β de la gélatine montre que dans la gamme de pH étudiés (4,2-7,0) plusieurs changements structuraux significatifs sont visibles.

À pH 4,2, la bande située à 1655 cm^{-1} subit un déplacement bathochrome vers 1648 cm^{-1} .

➤ L'effet dû au changement de pH

Le changement de pH de la solution de gélatine native mène à un déplacement hypsochrome de 1655 cm^{-1} vers 1648 cm^{-1} et 1641 cm^{-1} aux pH 5,2 et 7,0 respectivement. Le déplacement de ces bandes est associé à la structure de l'hélice α . Ces déplacements mènent à dire que la structure de la triple hélice est atteinte par le changement de pH (Allain *et al.*, 1999).

Le changement de pH conduit aussi à la variation de l'intensité de l'amide III qui est aussi associé à son tour à la triple hélice (Muyonga *et al.*, 2004).

➤ L'effet dû à l'addition de la NaCMC native

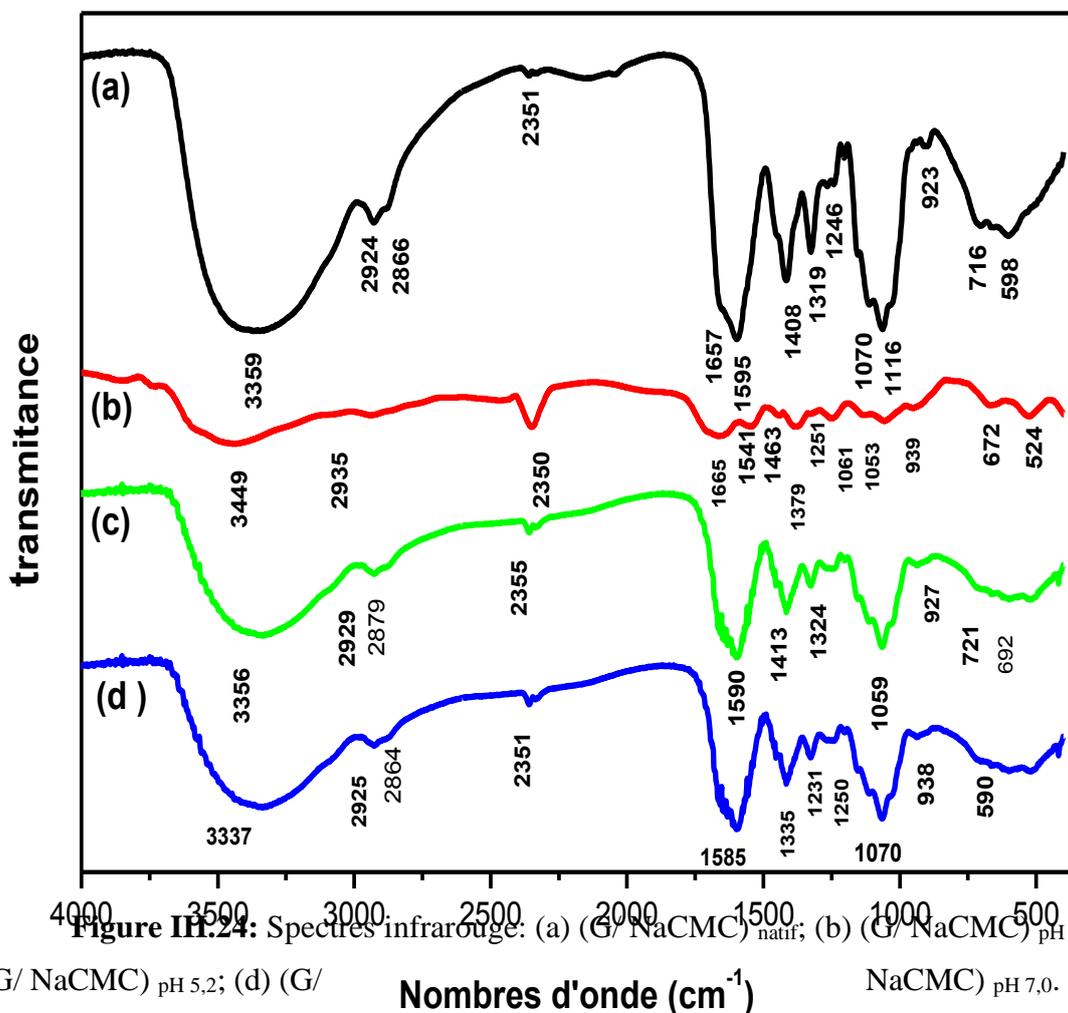
L'étude de l'effet de l'ajout de la NaCMC native sur la gélatine native par spectroscopie infrarouge est en accord avec les travaux menés par (Zaleska *et al.*, 2000), (Lii *et al.*, 2000) et, (Pal *et al.*, 2007). Les résultats montrent un déplacement bathochrome de 3326 cm^{-1} vers 3359 cm^{-1} de la bande des NH. Il est à noter aussi que la position du sommet de la bande maximale qui correspond aux vibrations d'élongation des groupes hydroxylés non carboxylés dans le cas de la NaCMC subit un déplacement bathochrome de 3333 cm^{-1} vers 3359 cm^{-1} , ceci est dû à l'implication du groupement hydroxyle de la NaCMC dans la complexation.

Les bandes de la gélatine qui apparaissent à 1161 cm^{-1} et 1081 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation C–O, subissent un déplacement hypsochrome pour les deux bandes vers 1116 cm^{-1} et à 1070 cm^{-1} respectivement.

À 2924 cm^{-1} et à 2866 cm^{-1} correspondant aux C-H aliphatiques asymétriques et symétriques respectivement (Lii *et al.*, 2000).

La déformation des C-H symétriques à 1403 cm^{-1} subit un déplacement bathochrome qui réapparaît à 1408 cm^{-1} (Lii *et al.*, 2000).

La bande localisée à 1596 cm^{-1} , caractéristique de la vibration asymétrique des groupements carboxyliques (COO^-) portées par les résidus d'acide glucuronique subit aussi un déplacement bathochrome vers 1657 cm^{-1} (**Figure III.24**).



Le suivi de l'influence du pH sur le phénomène de complexation de la gélatine avec la NaCMC, fait apparaître plusieurs changements dans les spectres dans la gamme de pH étudiée (4,2-7,0), qui se prononcent avec des déplacements hypsochromes surtout à pH 5,2 (1648 à 1590 cm^{-1}) et pH 7,0 (1641 à 1585 cm^{-1}). Cependant, ces déplacements des bandes sont associés à la structure de l'hélice α . Ces modifications mènent à conclure que la structure de l'hélice α est atteinte par le changement de pH aussi bien pour le cas de la gélatine seule, que pour la gélatine complexée avec la NaCMC (**Figure III.24**).

Pour pouvoir suivre l'effet des sels (NaCl , CaCl_2) et du glucose ajoutés au mélange natif et aux mélanges à différents pH, nous allons d'une manière brève élucider leur mode d'action

avec les protéines. Dans la littérature (**Rbii, 2010**) les ions de sels neutres peuvent réagir avec les charges des protéines et donc abaisser les interactions électrostatiques entre les charges opposées.

Sur la **figure III.25**, nous pouvons observer les différents types d'interactions susceptibles de stabiliser les structures protéiques.

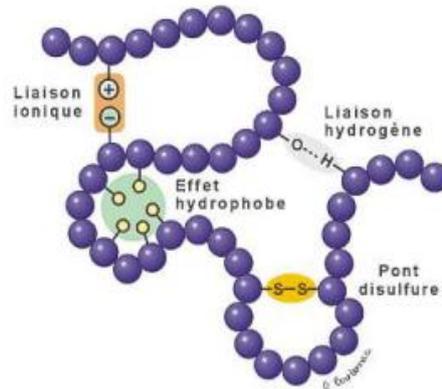


Figure III.25 : Les différents types d'interactions susceptibles de stabiliser les structures protéiques (**Rbii, 2010**).

D'après (**Tanford *et al.*, 1959**), la fixation des ions provoque la diminution du point isoélectrique (PIE) de la β -Lactoglobuline (β -Lg) en présence de KCl, NaCl ou CaCl₂, suggérant une affinité spécifique pour les cations K⁺, Na⁺ ou Ca²⁺ par l'intermédiaire des groupements carboxylates de la protéine.

D'autre part, il est déjà connu par (**Baomy *et al.*, 1988**), que la protéine présente des affinités pour les ions métalliques (Zn²⁺ > Fe²⁺ > Cu²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Mn²⁺).

En revanche, le glucose, le galactose ainsi que d'autres sucres sont souvent inclus dans la formulation des médicaments et des aliments, mais sont aussi présents naturellement en très faible quantité dans le collagène. La quantité varie fortement non seulement entre les différentes espèces mais aussi, dans certains cas, entre les différents tissus chez le même animal. Ainsi, dans les collagènes de mammifères, la teneur en glucides varie de 0.4% dans la peau à 4% dans les cartilages et jusqu'à 12.6% dans les muscles (**Bornstein et Traub, 1979**). Des sucres qui jouent un rôle dans la structure du collagène. La réaction entre des sucres et des fonctions amines libres a fait l'objet de nombreuses publications (**Cortesi *et al.*, 1998**).

Une des réactions très connue est la réaction de Maillard (ou brunissement non enzymatique), qui est un processus chimique complexe partant d'un composé aminique

(généralement des acides aminés) et d'un composé carbonyle (généralement un glucide) (**Biemel *et al.*, 2001**). Les processus mènent à la formation de systèmes complexes, hétérocycles et polymères solubles ou insolubles (le plus souvent de couleur brune). La réaction de Maillard, modifie la structure des protéines, aussi bien chimique que stérique. D'une façon générale, dans les produits alimentaires, la réaction se déroule soit entre les saccharides et des protéines (ou acides aminés libres), soit entre des aldéhydes (résultant de l'oxydation des acides gras non saturés) et des protéines (ou acides aminés libres). La réaction avec les protéines est rendue possible par la présence de groupements NH₂ libres situés aux extrémités des molécules (**Figure III.26**).

➤ **L'effet de l'ajout de NaCl, CaCl₂ et du glucose**

Pour suivre l'effet de NaCl, CaCl₂ et du glucose sur la structure de l'hélice α , nous avons suivi l'évolution de leur effet sur le mélange natif aussi bien que sur les mélanges à différents pH étudiés.

L'ajout de NaCl, CaCl₂ et du glucose au mélange natif apportent des déplacements bathochromes de l'amide I. Par contre, l'addition de CaCl₂ cause la disparition totale de la bande de l'amide III, d'une part (**Figure III.27**). D'autre part, leurs ajouts à pH 4,2 apportent des déplacements hypsochromes de 1665 cm⁻¹ à 1648 cm⁻¹, 1633 cm⁻¹ et 1662 cm⁻¹ respectivement (**Figure III.28**). Alors, à pH 5,2 (de 1590 cm⁻¹ à 1648 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹, 1662 cm⁻¹) et pH 7,0 (de 1585 cm⁻¹ à 1614 cm⁻¹, 1641 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹), on observe des déplacements bathochromes, cela mène à dire que les effets combinés dus au changement de pH et l'addition des différents additifs apportent aussi des modifications conformationnelles « locales » de la triple hélice (**Figures III.29-30**).

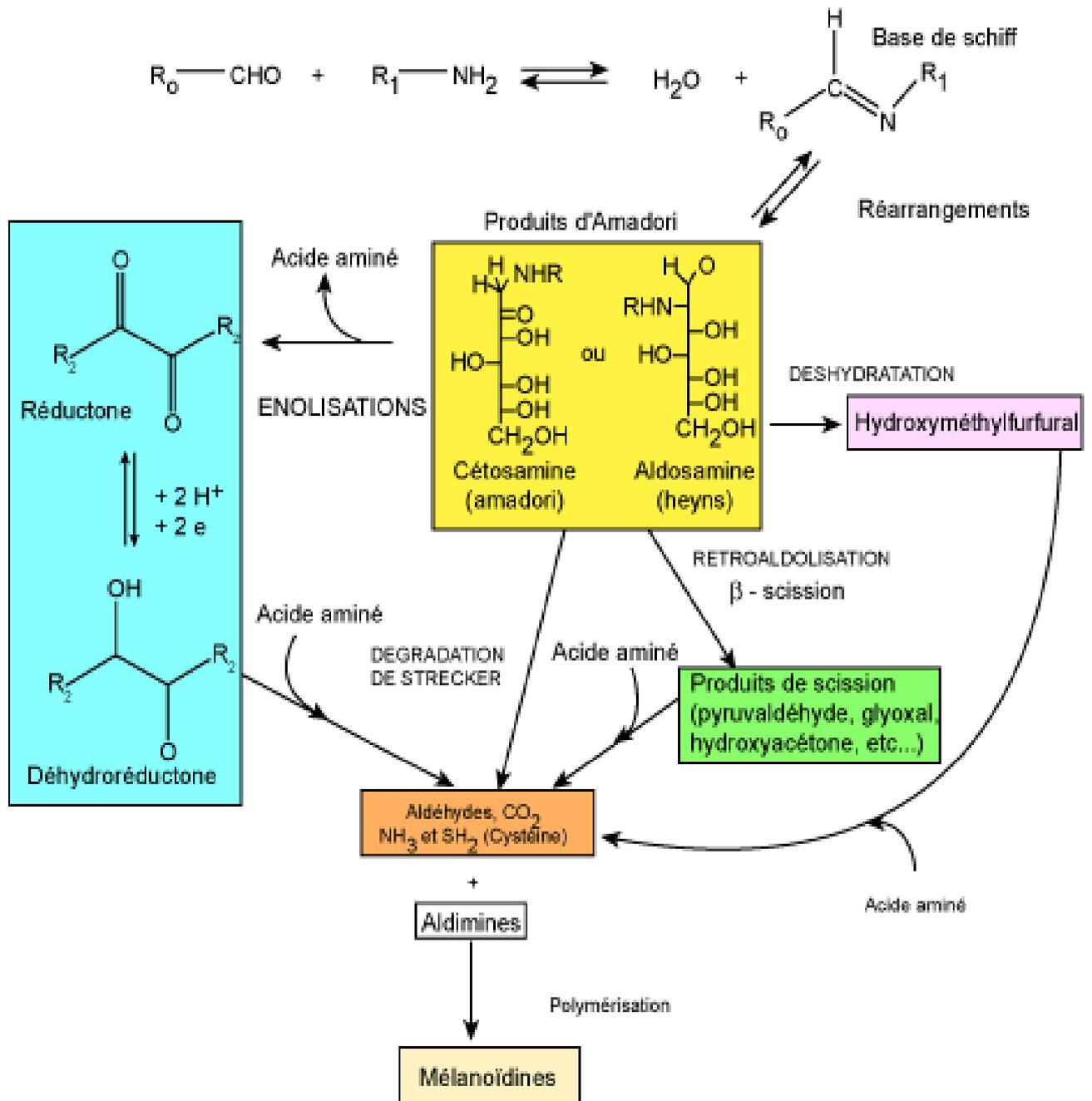


Figure III.26 : Réaction de Maillard (Biochem-Agro).

Notant aussi que la bande de l'amide III est presque inexistante surtout sous l'effet de CaCl₂ à pH 5,2 et 7,0. Ces changements sont indicatifs d'un grand désordre (Friess et Lee, 1996) dans la gélatine qui est associé à la perte de la triple hélice.

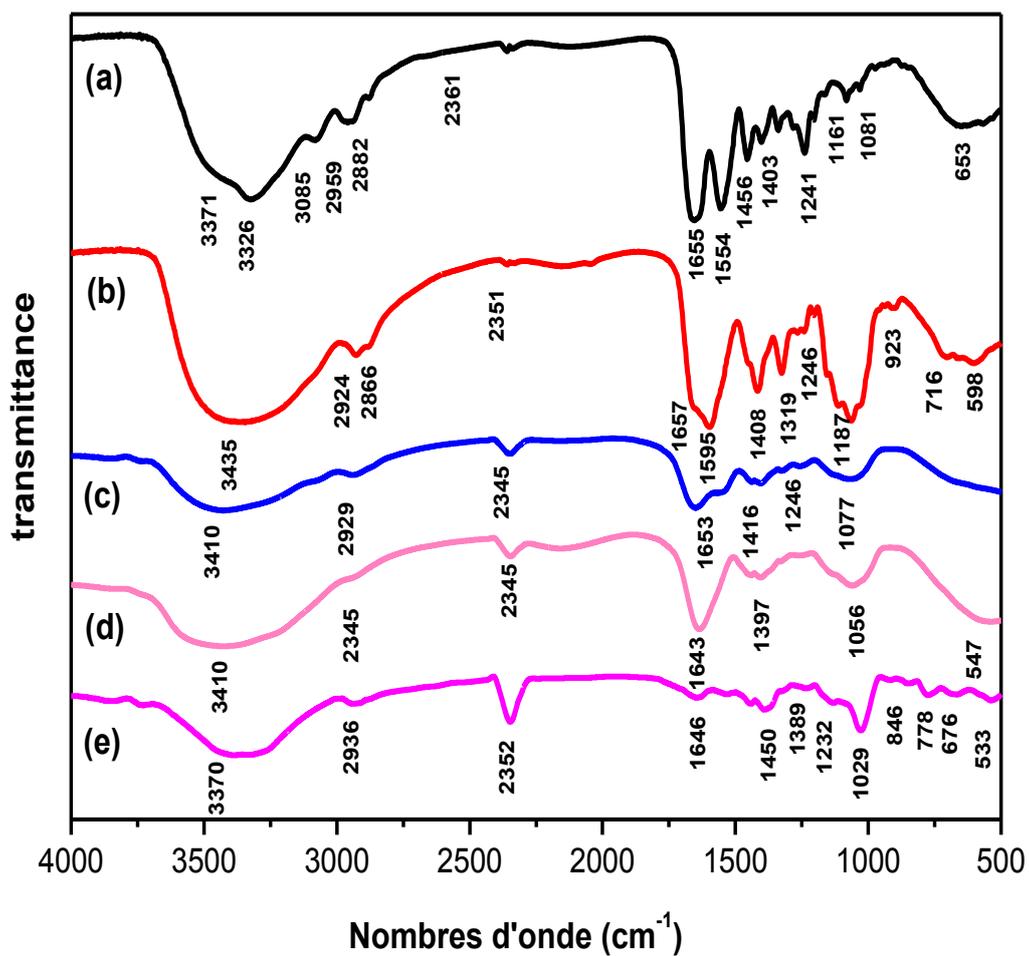


Figure III.27 : Spectres infrarouge : (a) G_{native} ; (b) $(G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}$; (c) $((G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}/\text{NaCl})$; (d) $((G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}/\text{CaCl}_2)$; (e) $((G/\text{NaCMC})_{\text{natif}}/\text{glucose})$.

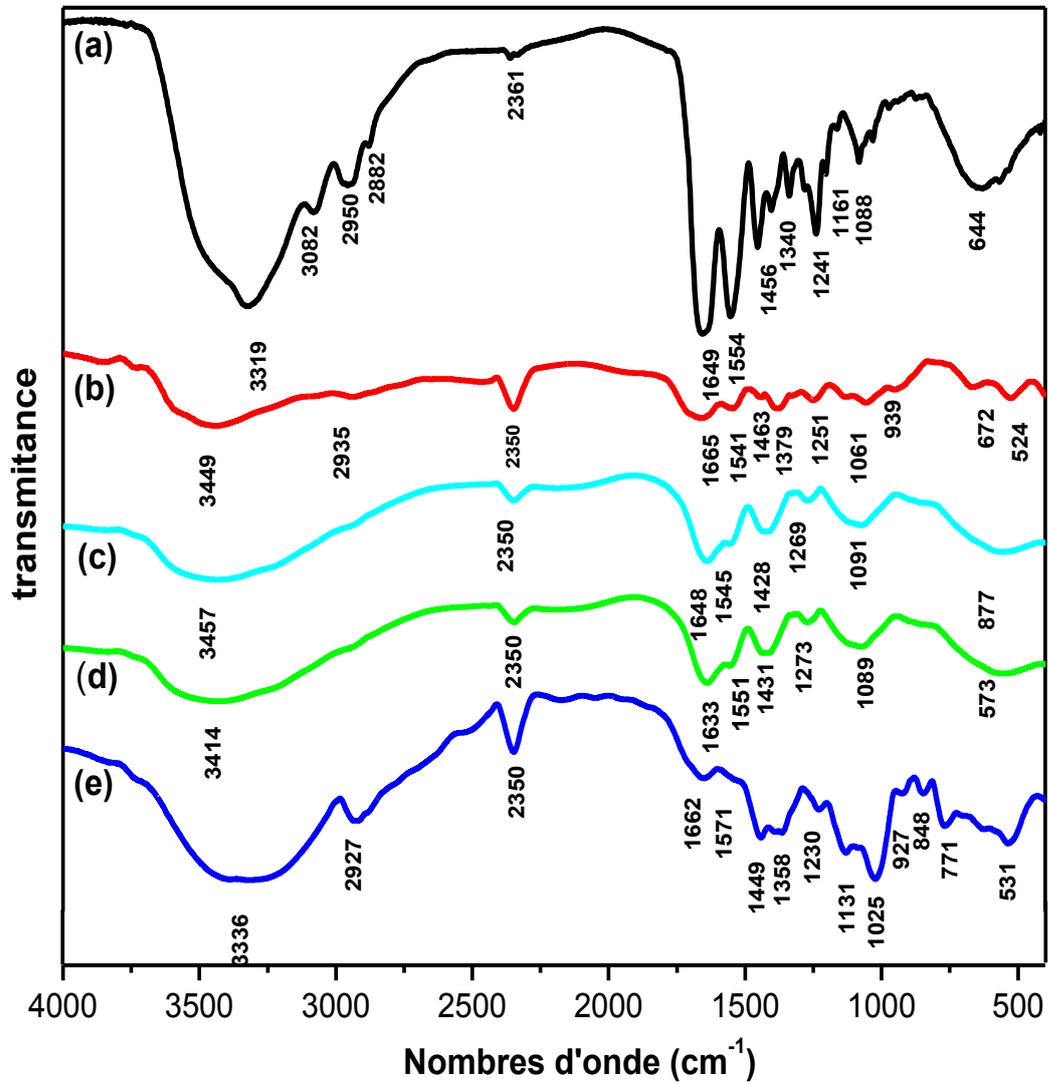


Figure III.28 Spectres infrarouge : (a) $G_{\text{pH } 4.2}$; (b) $(G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 4.2}$; (c) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 4.2} / \text{NaCl})$; (d) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 4.2} / \text{CaCl}_2)$; (e) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 4.2} / \text{glucose})$.

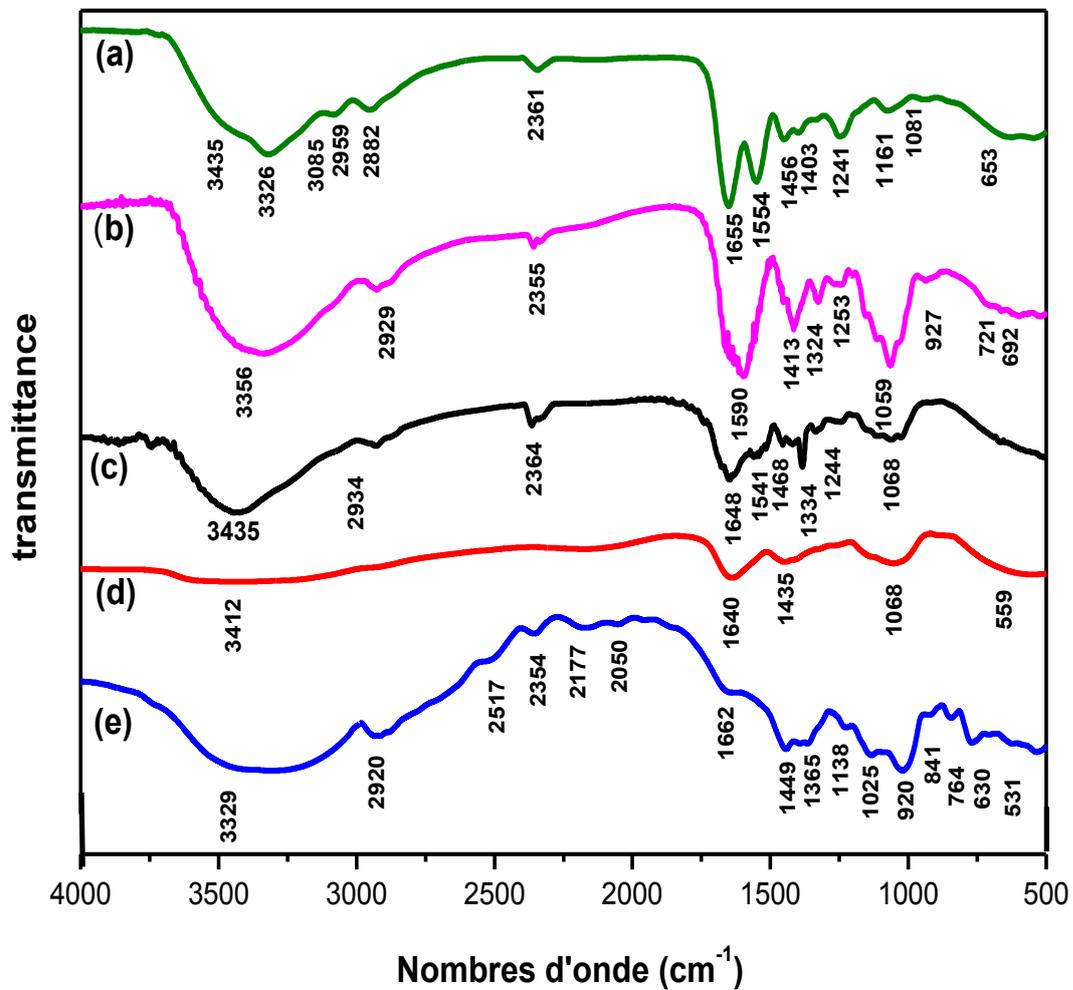


Figure III.29 : Spectres infrarouge : (a) $G_{\text{pH } 5,2}$; (b) $(G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 5,2}$; (c) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 5,2} / \text{NaCl})$; (d) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 5,2} / \text{CaCl}_2)$; (e) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 5,2} / \text{glucose})$.

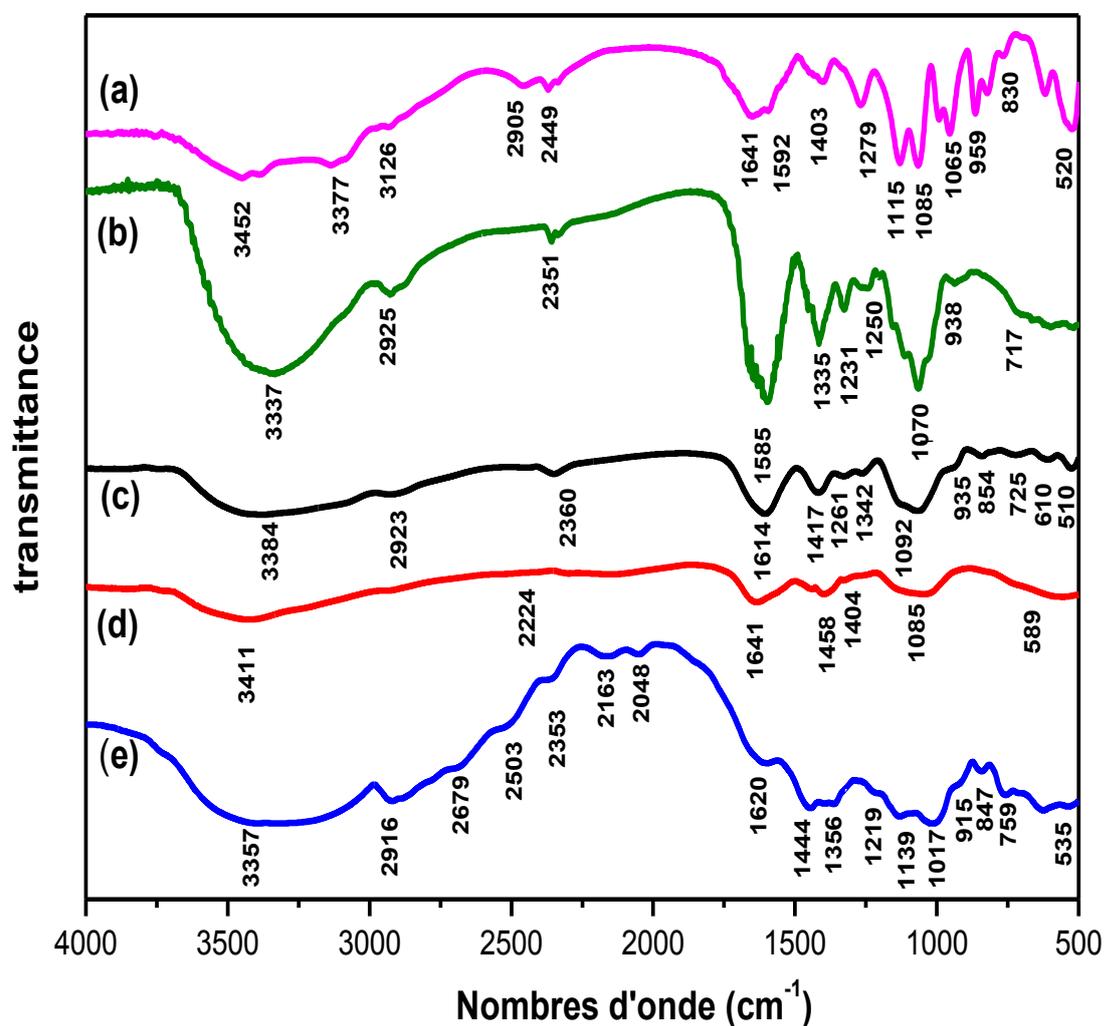


Figure III. 30 : Spectres infrarouge : (a) $G_{\text{pH } 7,0}$; (b) $(G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 7,0}$; (c) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 7,0} / \text{NaCl})$; (d) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 7,0} / \text{CaCl}_2)$; (e) $((G/ \text{NaCMC})_{\text{pH } 7,0} / \text{glucose})$.

III-1-7. Diffraction des rayons X

Le diffractogramme des rayons X de la NaCMC native exhibe trois larges pics qui apparaissent aux angles 2θ à environ respectivement $16,82^\circ$, $29,81^\circ$ et $41,08^\circ$. Ce qui indique que la NaCMC est un matériau amorphe (Figure III.31, Tableau III.1).

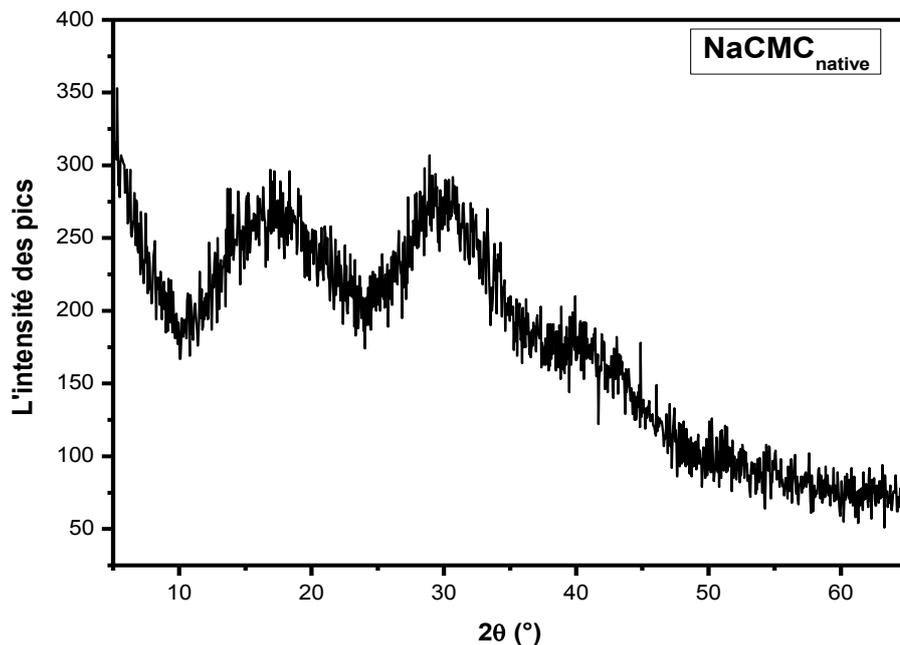


Figure III.31: Diffractogramme rayons X de NaCMC native.

Tableau III.1: Diamètre inter réticulaire de la NaCMC native.

Composition	2θ (°)	d_{hkl} (Å)
NaCMC _{native}	16,82	5,27
	29,81	2,99
	41,08	2,19

Par contre, l'analyse par diffraction des rayons X de la gélatine native montre que son diffractogramme présente un pic fin qui se localise à $7,74^\circ$, s'accompagnant de trois larges pics qui se situent respectivement à $16,59^\circ$, $29,72^\circ$ et $40,80^\circ$ (**Figure III. 32, Tableau III.2**).

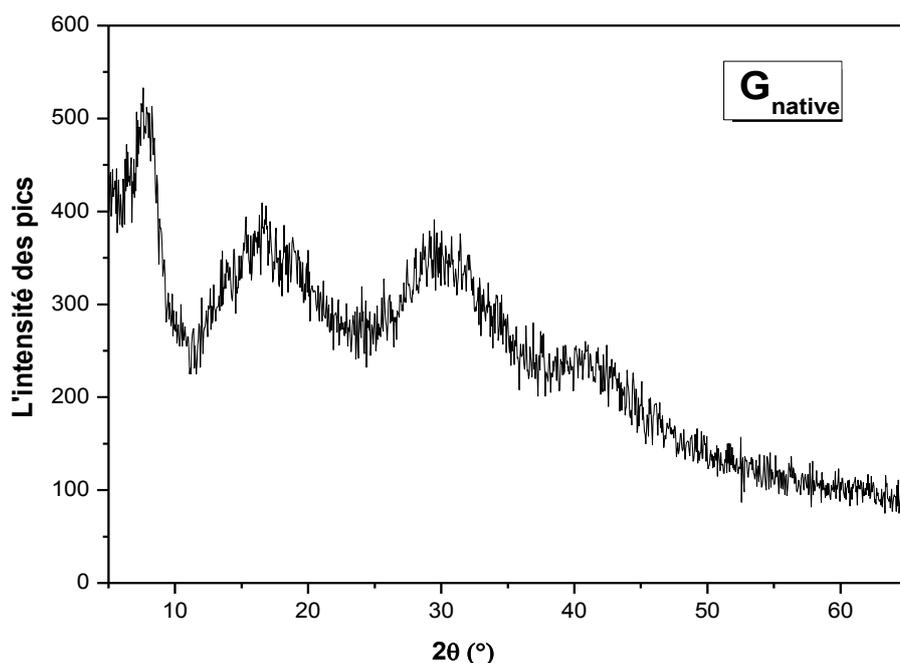


Figure III.32: Diffractogramme rayons X de la gélatine native.

Tableau III.2: Diamètres inter réticulaire de la G_{native} et du mélange $(G/NaCMC)_{\text{natif}}$.

Composition	2θ (°)	d_{hkl} (Å)
G_{native}	7,74	22,94
	16,59	5,36
	29,72	3,00
	40,80	1,27
$(G/NaCMC)_{\text{natif}}$	16,57	5,35
	30,44	2,93
	41,60	1,52

➤ **L'effet dû à l'addition de la NaCMC**

Selon (Bigi *et al.*, 2004), l'apparition du pic aux environ de 8° , est liée au diamètre de la triple hélice. Son intensité est associée au taux de cette dernière.

Des travaux menés par (Zunying *et al.*, 2012) sur le chitosane, par (Penă et Koro, 2010) sur le tanin et enfin par (Rivero *et al.*, 2009) sur le glycérol, ont pu montrer que leur addition à la

gélatine se manifeste le plus souvent par une diminution de l'intensité du premier pic qui se situe entre 7-8°, voire sa disparition complète.

L'addition de la NaCMC à la gélatine induit la disparition de ce premier pic de diffraction à 7,74° avec élargissement des autres pics (**Figure III.33**). Le mélange formé est considéré plus amorphe que la gélatine seule. Ceci illustre, comme il a été trouvé ultérieurement dans les travaux de (**Kim et al., 1993; Lee et al., 1999; Zunying et al., 2012**), que la présence de la NaCMC diminue la cristallinité de la gélatine. Ce qui est dû à une interaction significative entre les deux macromolécules.

Ceci est aussi en accord avec les travaux réalisés par (**Langmaier et al., 2008**) et (**Rivero et al., 2009**), qui confirment que ce phénomène de changement structural et de diminution de cristallinité est effectivement attribué à l'interaction entre la gélatine et la NaCMC.

(**Chen et al., 2008**) et (**Bergo et al., 2007**) ont observé un effet similaire dans le cas de la gélatine contenant du glycérol. Des constatations identiques ont été transmises par les travaux réalisés par (**Zunying Liu et al., 2012**) entre la gélatine et le chitosane.

(**Andreuccetti et al., 2011**) suggèrent aussi que le caractère amorphe des films de gélatine contenant du glycérol, est dû à l'absence de la recristallisation et aux régions semi-cristallines durant la production du film.

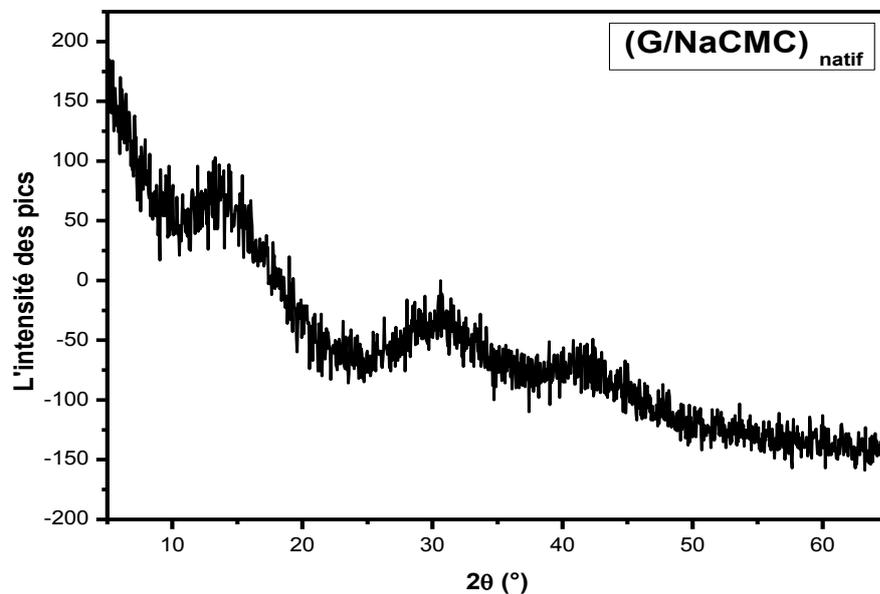


Figure III.33: Diffractogramme rayons X du mélange (G/NaCMC) natif .

➤ **L'effet dû au changement de pH**

À pH égal à 4,2, l'addition de la NaCMC à la gélatine induit aussi une baisse du premier angle de diffraction qui apparaît à $8,06^\circ$ (**Figure III.34, Tableau III.3**) dans le cas de la gélatine seule, à $5,66^\circ$ dans le cas du mélange (**Figure III.35**) et par conséquent à une augmentation du diamètre inter réticulaire de la triple hélice (**Tableau III.3**).

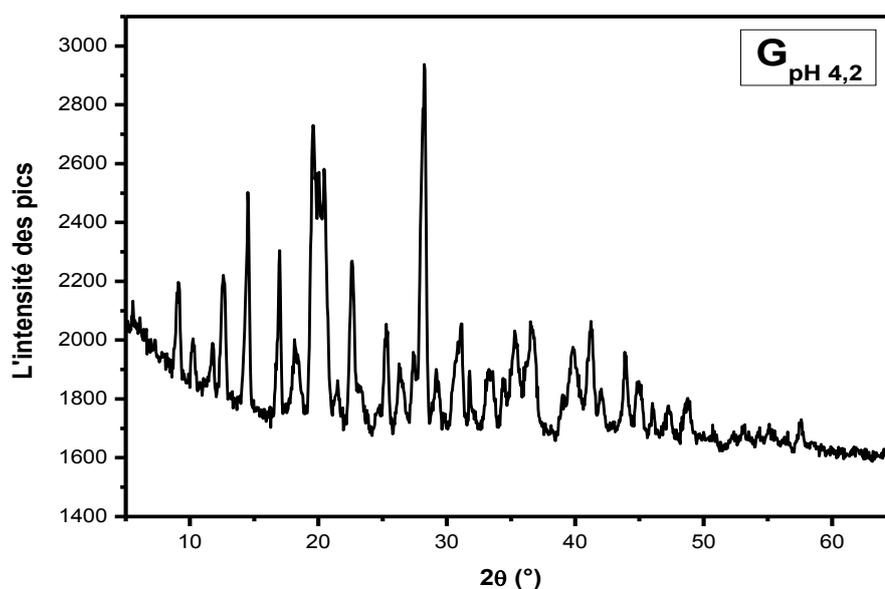


Figure III.34: Diffractogramme rayons X de la gélatine à pH 4,2 ($G_{\text{pH } 4,2}$).

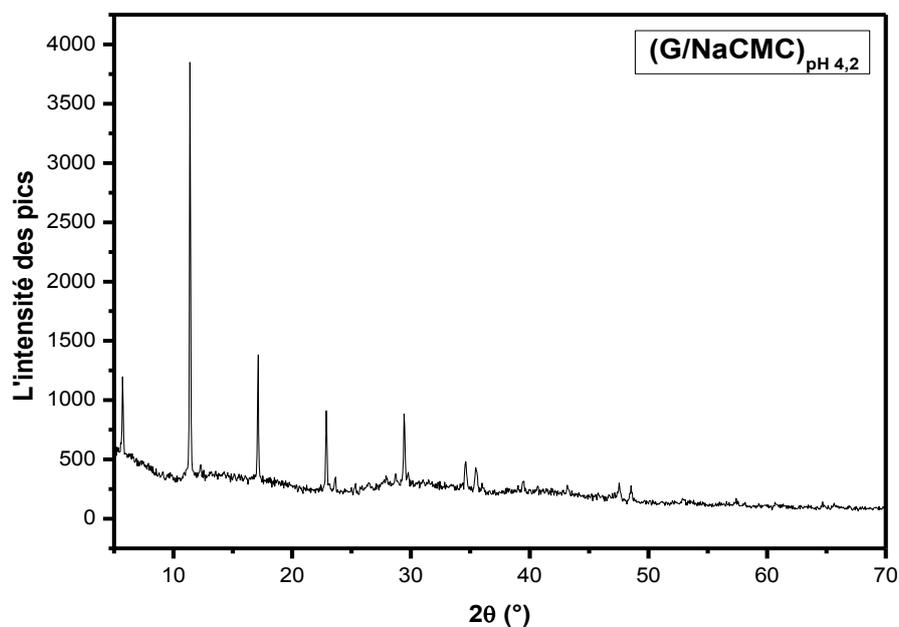


Figure III.35: Diffractogramme rayons X du mélange (G/NaCMC)_{pH 4,2}.

Tableau III.3: Diamètres inter réticulaire de la (G_{pH 4,2}) et du mélange (G/NaCMC)_{pH 4,2}.

Composition	2 θ (°)	d _{hkl} (Å)
G _{pH 4,2}	8,06	10,96
	16,57	5,35
	29,80	2,99
	40,39	2,23
(G/NaCMC) _{pH 4,2}	5,66	15,61
	11,31	7,82
	17,06	5,19
	22,82	3,89
	29,26	3,05

Par contre aux pH 5,2 (**Figure III.38, Tableau III.6**) et 7,0 (**Figure III.39, Tableau IV.7**), le premier pic a complètement disparu en comparaison avec la gélatine native et la gélatine à pH 4,2, ce qui conduit à la diminution du taux d'hélicité.

➤ **L'effet de l'ajout de NaCl, CaCl₂ et du glucose**

L'ajout de NaCl et du CaCl₂ au mélange natif (**Figure III.36**) et au mélange à différents pH (**Figures III.37-III.39**) induit, d'une manière générale, la disparition complète du premier pic en comparaison avec la gélatine native, ce qui provoque aussi la diminution du taux d'hélicité.

Par contre l'addition du glucose provoque l'effet inverse, avec apparition aux environ de 9° pour le mélange natif ainsi que pour les mélanges à différents pH, impliquant ainsi une augmentation du diamètre inter réticulaire de la triple hélice. La structure ainsi formée protège les protéines contre la dénaturation thermique, ralentit leur déploiement et leur tendance à l'agrégation (**Bull, 1978**). C'est pour cette raison qu'on a eu une réapparition du premier pic indiquant qu'un certain ordre s'instaure au niveau des chaînes de la gélatine toute en la protégeant contre la dénaturation.

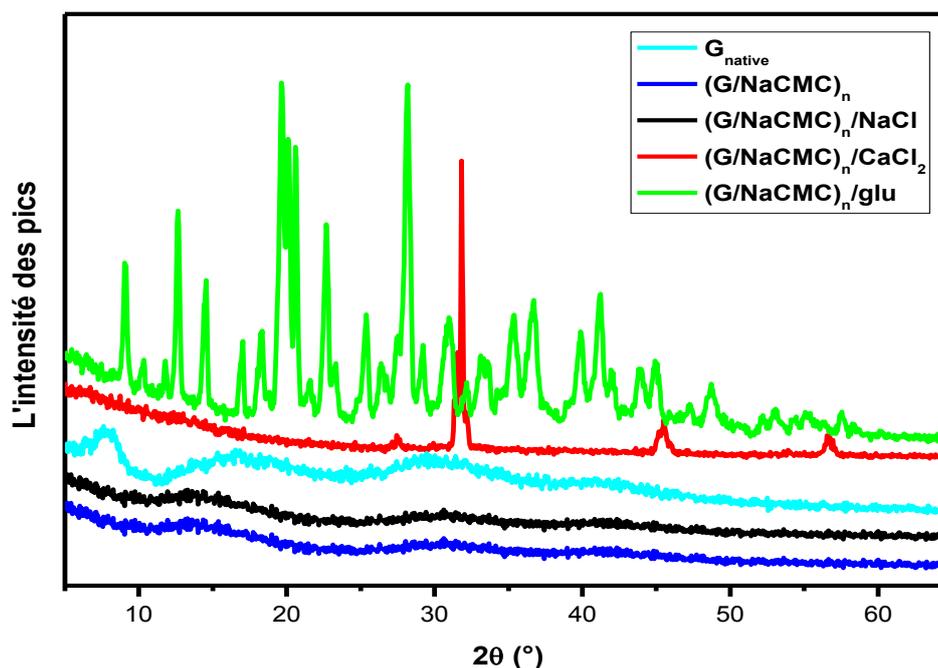


Figure III.36: Diffractogramme rayons X de la G_{native} et du mélange (G/NaCMC)_{native} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Tableau III.4: Diamètres inter réticulaire de la G_{native} et du mélange (G/NaCMC)_{native} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	2θ (°)	d _{hkl} (Å)
G _{native}	7,74	22,94
	16,59	5,36
	29,72	3,00
	40,80	1,27
(G/NaCMC) _{native}	16,57	5,35
	30,44	2,93
	41,60	1,52
(G/NaCMC) _{native} /NaCl	13,81	6,41
	30,50	2,02
	41,38	0,76
(G/NaCMC) _{native} /CaCl ₂	27,50	3,24
	31,84	2,81
	45,50	1,99
(G/NaCMC) _{native} /glu	9,03	9,79
	12,47	7,09
	19,63	4,52
	28,12	3,17
	36,62	2,45
	41,11	2,19

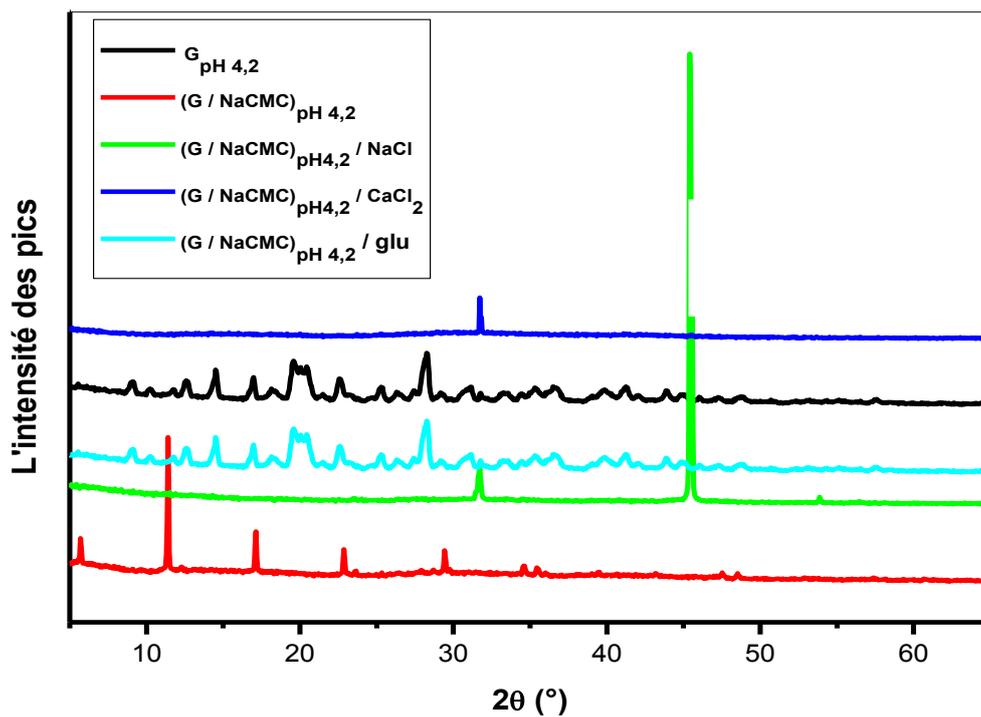


Figure III.37: Diffractogramme rayons X de la $(G_{pH\ 4,2})$ et du mélange $(G/NaCMC)_{pH\ 4,2}$ en absence et en présence de NaCl, $CaCl_2$ et du glucose.

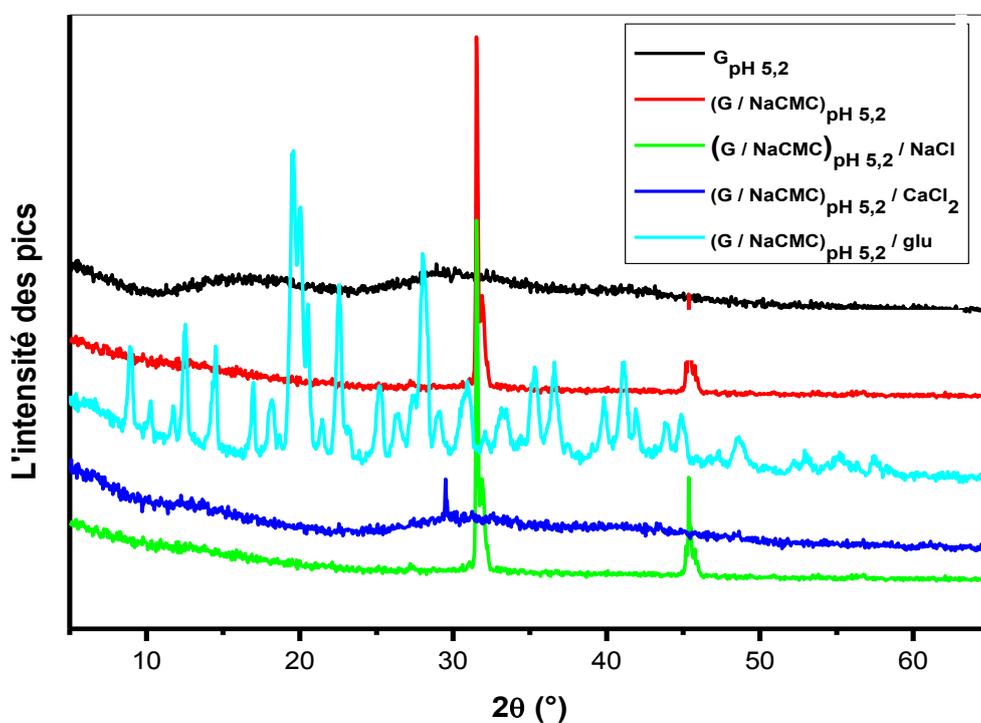


Figure III.38: Diffractogramme rayons X de la $(G_{pH5,2})$ et du mélange $(G/NaCMC)_{pH5,2}$ en absence et en présence de NaCl, $CaCl_2$ et du glucose.

Tableau III.5: Diamètres inter réticulaire de la (G_{pH4,2}) et du mélange (G/NaCMC)_{pH 4,2} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	2θ (°)	d_{hkl} (Å)
G_{pH 4,2}	8,06	10,96
	16,57	5,35
	29,80	2,99
	40,39	2,23
(G/NaCMC)_{pH 4,2}	5,66	15,61
	11,31	7,82
	17,06	5,19
	22,82	3,89
(G/NaCMC)_{pH 4,2}/NaCl	29,26	3,05
	27,28	3,26
	31,64	2,82
	45,40	1,99
(G/NaCMC)_{pH 4,2}/CaCl₂	56,54	1,62
	15,49	5,72
	31,80	2,81
	42,35	2,13
(G/NaCMC)_{pH 4,2}/glu	9,11	9,70
	19,63	4,52
	28,06	3,17
	41,26	2,18

Tableau III.6: Diamètres inter réticulaire de la (G_{pH5,2}) et du mélange (G/NaCMC)_{pH 5,2} en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	2θ (°)	d_{hkl}(Å)
G_{pH 5,2}	15,93	5,56
	29,58	3,01
	41,03	2,19
(G/NaCMC)_{pH 5,2}	15,49	5,72
	31,44	2,84
	43,44	2,08
(G/NaCMC)_{pH 5,2}/ NaCl	31,70	2,82
	45,32	2,00
	66,10	0,70
(G/NaCMC)_{pH 5,2}/ CaCl₂	13,77	6,43
	29,46	3,03
	41,38	2,18
(G/NaCMC)_{pH 5,2}/glu	9,03	9,79
	19,90	4,46
	27,86	3,20
	41,11	2,19

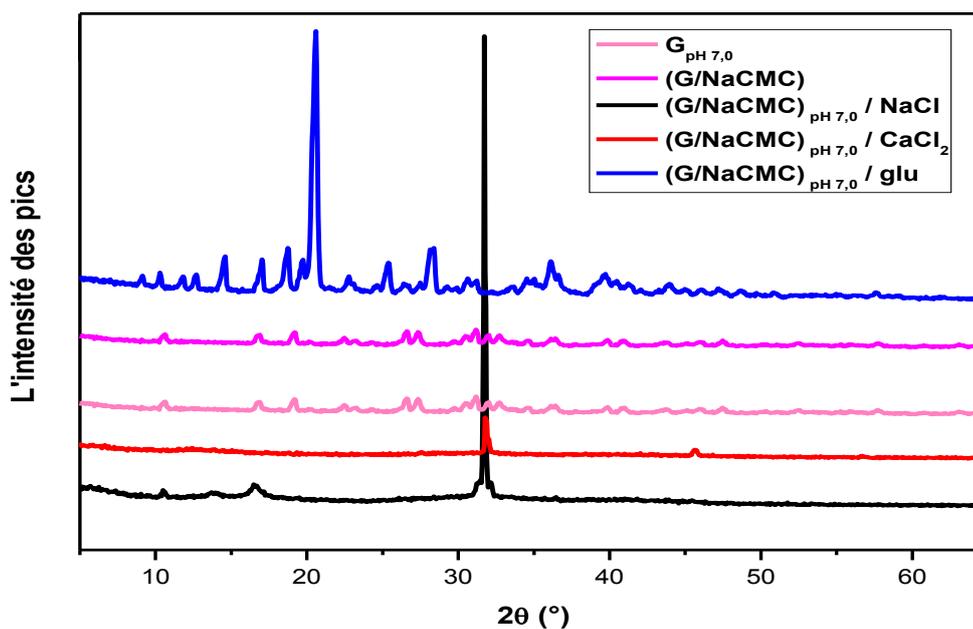


Figure III.39: Diffractogramme rayons X de la ($G_{pH7,0}$) et du mélange $(G/NaCMC)_{pH7,0}$ en absence et en présence de NaCl, $CaCl_2$ et du glucose.

Tableau III.7: Diamètres inter réticulaire de la ($G_{pH7,0}$) et du mélange $(G/NaCMC)_{pH7,0}$ en absence et en présence de NaCl, $CaCl_2$ et du glucose.

Composition	2θ (°)	d_{hkl} (Å)
$G_{pH7,0}$	10,46	8,45
	26,54	3,35
	40,94	2,20
$(G/NaCMC)_{pH7,0}$	16,79	5,28
	30,12	2,96
$(G/NaCMC)_{pH7,0}/NaCl$	10,36	8,53
	16,45	5,38
	31,80	2,81
	66,33	1,40
$(G/NaCMC)_{pH7,0}/CaCl_2$	12,47	7,09
	31,84	2,81
	45,67	1,98
$(G/NaCMC)_{pH7,0}/glu$	66,30	1,40
	9,03	9,79
	20,45	4,34
	28,39	3,14
	36,08	2,48
	39,80	2,26

III-1-8. Etude de l'évolution des paramètres optiques en fonction de la concentration

Un état polarisé correspond au fait que le vecteur lumineux prend une direction particulière, qui avec la direction de propagation de l'onde, permet de définir le plan de vibration ou de polarisation. C'est un phénomène courant dans la nature. La lumière du ciel, diffusée par les molécules atmosphériques, est partiellement polarisée. Certains animaux comme les abeilles ou les fourmis s'orientent ou trouvent leur nourriture grâce à elle d'une part, d'autre part, toute onde optique peut être représentée par quatre paramètres : l'intensité, la fréquence, la polarisation et la phase. Nous nous intéressons dans notre étude à la polarisation qui décrit l'évolution temporelle du vecteur champ électrique (**Cherif, 2010**).

La polarisation d'une onde lumineuse subit une transformation lorsqu'elle traverse un milieu ou qu'elle est renvoyée par une cible. Cette variation de l'état de polarisation de l'onde permet alors de caractériser le système considéré. L'étude du passage de la lumière à travers une succession d'éléments polarisants peut alors être facilitée par l'utilisation de divers formalismes (**Boulvert, 2006**). En 1852, (**Stokes,1952**) pose les fondements mathématiques de la polarisation de la lumière en introduisant quatre paramètres associés à des grandeurs mesurables, connus sous le nom de paramètres de Stokes. Par la suite, en 1892, (**Poincare,1892**), démontra que l'ensemble des états purs de polarisation peut être visualisé sur une sphère. Dans une série de huit articles publiés entre 1941 et 1947, (**Jones, 1941-1947**), a introduit une nouvelle méthode de calcul permettant de décrire le comportement d'une onde polarisée à travers des éléments optiques. Cependant il existe une alternative, le formalisme de Mueller (ou de Stokes-Mueller) (**Cherif, 2010**), et c'est celui-ci que nous avons pris en considération dans le cas échéant.

Une matrice de Mueller est une matrice de diffusion d'un milieu donné. Par analogie avec l'électronique, une matrice de Mueller représente la matrice de transfert du milieu considéré entre un vecteur de Stokes d'entrée et un vecteur de Stokes de sortie (**Cherif, 2010**).

Ce formalisme d'algèbre linéaire permet ainsi d'analyser les modifications polarimétriques qu'engendre le système sur le rayonnement incident. En conservant le parallèle avec le formalisme de Jones, nous tâcherons de caractériser les matrices de Mueller par des indices liant les aspects purement polarimétriques et les propriétés optiques (**Cherif, 2010**).

III-1-8-1. Les principales propriétés polarimétriques

Toute matrice de Mueller peut être caractérisée par quatre propriétés principales, le dichroïsme (ou diatténuation), la polarisance, la biréfringence et le pouvoir de dépolarisation (**Boulvert, 2006**).

➤ **Dichroïsme ou Diatténuation**

Le dichroïsme D d'un élément optique est son anisotropie de transmission, autrement dit la dépendance de sa transmission en fonction de la polarisation incidente. C'est la seule propriété (avec la polarisance) directement lisible sur les éléments de la matrice de Mueller M la plus générale (**Boulvert, 2006**).

➤ **Polarisance**

La polarisance P est définie comme le degré de polarisation introduit par un élément optique sur un faisceau incident non polarisé (**Boulvert, 2006**).

➤ **Biréfringence ou retard**

La biréfringence est liée à la variation de l'indice optique en fonction de la polarisation incidente, et donc au déphasage que l'élément peut introduire entre différents états de polarisation (**Boulvert, 2006**).

➤ **Pouvoir de dépolarisation**

Il s'agit de la capacité du composant de réduire le degré de polarisation d'une onde incidente (**Boulvert, 2006**).

Dans ce contexte le suivi de l'évolution des différents paramètres optiques (degré de polarisation, diatténuation, retard de phase) en fonction de la concentration des différentes solutions à différents pH a été étudié dans ce travail.

III-1-8-2. Etude polarimétrique des solutions natives à différents pH

D'après **Maitland (Maitland, 1995)**, les fibres de collagène présentent la particularité d'avoir un comportement anisotrope (biréfringence linéaire) qui sera plus ou moins marqué suivant leur organisation dans l'espace.

Les fibres de collagène sont également présentes dans les tendons et les ligaments. Dans ces tissus la biréfringence est plus importante puisque ces fibres sont orientées. Par contre, dans le derme de la peau, les fibres de collagène s'orientent plus aléatoirement (au repos) et dans ce cas la biréfringence induite est plus faible.

Ce comportement anisotrope (biréfringence) des fibres de collagène disparaît à partir d'une certaine température (environ 60°C) car le collagène se dénature thermiquement et se déstructure en gélatine puisque les liaisons hydrogène se brisent (**Maitland, 1995**) d'un point de vue théorique.

D'un point de vue expérimental, toutes les solutions préparées pour le cas de la gélatine et les mélanges G/NaCMC à différents pH présentent le même comportement qualitatif polarimétrique :

* Forte polarisation au caractère faiblement anisotrope (**Maitland, 1995**). Toutes les solutions présentent une forte polarisation (P bien inférieur à 1) (**voir annexe A3**). Ce résultat est tout à fait attendu étant donné que la gélatine issue du collagène est un milieu fortement diffusant (**Boulvert, 2006**);

- * Biréfringence ;
- * Dichroïsme.

Par contre, ce comportement est différent d'un point de vue quantitatif. C'est pourquoi, afin de différencier entre les différentes solutions préparées, nous choisissons d'utiliser, le degré de polarisation comme premier agent de contraste.

La **figure III.40** décrit l'évolution du degré de polarisation P en fonction de la concentration. Les valeurs du degré de polarisation des solutions natives de gélatine sont dépendantes du pH des solutions et sont moins élevées à pH neutre qu'à pH acide (près du pIE).

L'augmentation de la concentration en protéines à pH 4,2 a généralement pour effet de diminuer le degré de polarisation et ceci pour les concentrations qui se situent dans l'intervalle (0,2% à 0,4%). Par contre, à pH 5,2 et pH neutre 7,0, cette diminution du degré de polarisation se situe à une concentration 0,3% et 0,2% respectivement. Cette diminution du degré de polarisation reflète que la quantité de la lumière qui perd sa polarisation initiale augmente avec l'augmentation du pouvoir diffusant du milieu, d'une part. D'autre part, on a pu aussi remarquer que le degré de polarisation diminue de manière rapide plus particulièrement à pH 4,2 au fur et à mesure qu'on augmente la concentration en protéine, puisqu'il y a moins de solvant disponible, les protéines peuvent s'agréger rapidement qu'à faible concentration. Cette diminution est plus remarquable à pH 4,2 qu'à pH 5,2 puisqu'il y a un plus grand nombre d'interactions hydrophobes intramoléculaires présentes au pIE des protéines. Nous pouvons expliquer cette allure par le fait que le pouvoir diffusant du milieu augmente rapidement au début puis il commence à augmenter faiblement surtout à pH 7,0 (**Figure III.40**).

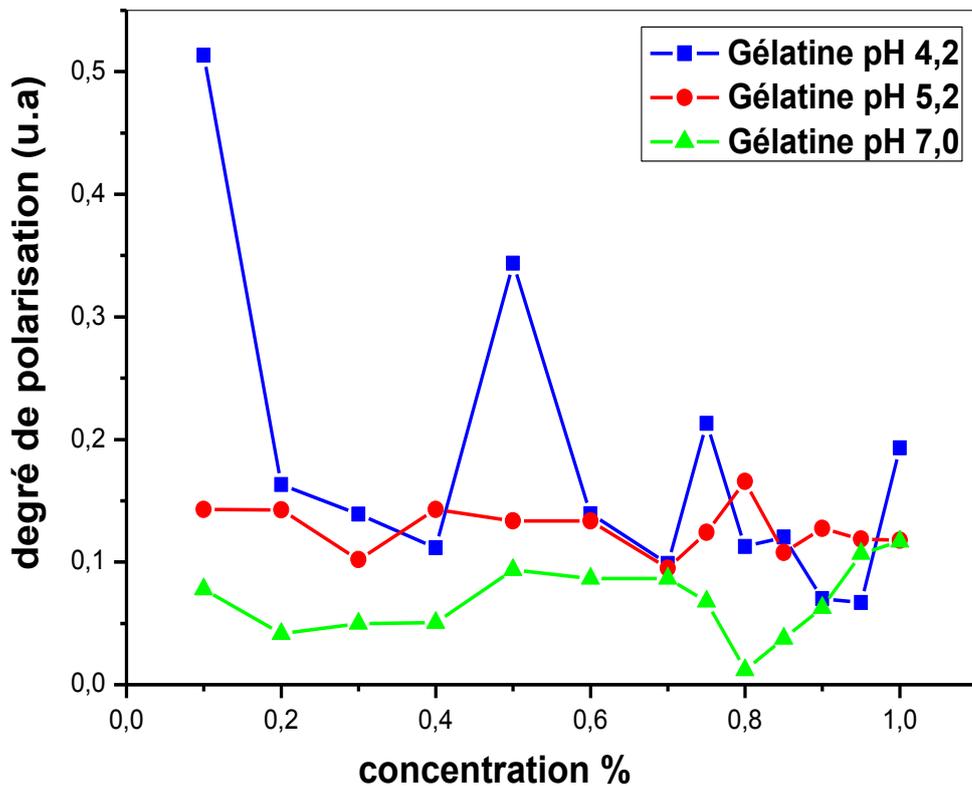


Figure III.40: Evolution du degré de polarisation de la gélatine à différents pH en fonction de la concentration.

C'est pour cette raison que le degré de polarisation diminue rapidement puis lentement. Donc on peut conclure que, plus la concentration est élevée, moins la solution polarise la lumière qui lui est incidente. Cette évolution de la polarisation indiquerait une modification structurale de l'hélice α de la gélatine sous l'effet du pH, ce qui concorde avec les résultats trouvés par infrarouge (**Figure III.23**).

➤ **Le suivi du degré de polarisation lors de l'ajout de la NaCMC à la gélatine**

À pH 4,2 et 5,2, les valeurs du degré de polarisation obtenues pour le mélange sont supérieures à celles obtenues pour la gélatine seule (**voir annexe A3**), ceci nous mène à dire que l'addition de la NaCMC à la gélatine varie le pouvoir diffusant du milieu (**Figure III.41**), ce qui révèle probablement qu'une interaction significative s'est instaurée entre les deux biopolymères.

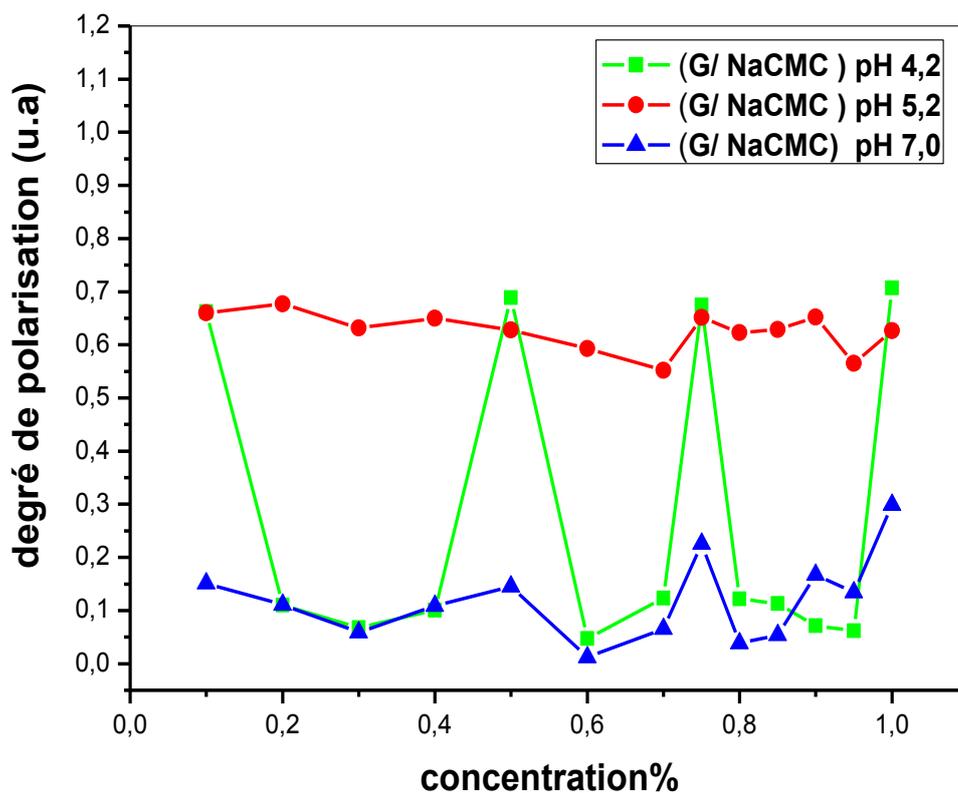


Figure III.41: Evolution du degré de polarisation du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

Ces interactions sont des forces électrostatiques gouvernant le processus de complexation. Cependant ce processus d'association s'explique également d'un point de vue entropique (**Ou et Muthukumar, 2006**). Lors de l'ajout d'un polyélectrolyte de charge opposée, avec lui aussi son cortège de contre-ions, l'association des deux polymères va libérer un grand nombre de contre-ions en solution ; ce qui représente un gain d'entropie se traduisant par une augmentation du désordre en solution. Cette variation d'entropie est un facteur favorisant la formation des polyélectrolytes (**Pépin, 2010**).

Cependant, cette augmentation du degré de polarisation est associée à la structure de l'hélice α . Ceci mène à dire que la structure de l'hélice α est atteinte par le changement de pH aussi bien pour le cas de la gélatine seule, que pour la gélatine complexée avec la NaCMC surtout à pH 4,2 et 5,2.

Par contre, à pH 7,0, son ajout à la gélatine conduit à un effet inverse, c'est-à-dire une diminution du degré de polarisation qui est très apparente.

On a pu aussi constater que le degré de polarisation présente des valeurs élevées aux mêmes concentrations (0,1%, 0,5%, 0,75% et 1%) à pH 4,2 et 7,0.

Concernant le dichroïsme (diatténuation), la description de son évolution pour l'étude des mélanges à différents pH lors de l'addition de la NaCMC, est comme suit (**Figure III.42**):

À pH 4,2, nous avons pu constater que les valeurs du dichroïsme ont baissé en comparaison à celles obtenues pour la gélatine seule, à l'exception de deux concentrations (0,9%, 0,95%) (**Tableau A3.3, voir annexe A3**), où on a une interaction maximale entre les deux biopolymères, ceci a été aussi confirmé pour le degré de polarisation à ce même pH mais pour des concentrations différentes (0,1%, 0,5%, 0,75% et 1%).

À pH 5,2, les valeurs du dichroïsme ont baissé d'une manière générale sauf aux concentrations (0,2%, 0,5%, 0,75% et 1%) (**Tableau A3.6, Annexe A3**).

Par contre, à pH 7,0 il a augmenté d'une manière générale, sauf aux concentrations élevées (0,9%, 0,95% et 1%) où il a baissé (**Tableau A3.9, voir annexe A3**).

Pour la biréfringence (retard de phase) (**Figure III.43**), à pH 4,2 (**Tableau A3.3, voir annexe A3**) et 7,0 (**Tableau A3.9, voir annexe A3**) les valeurs ont baissé d'une manière générale contrairement à pH 5,2 (**Tableau A3.6, voir annexe A3**) en comparaison avec la gélatine seule à ces mêmes pH.

➤ **L'effet des sels et du glucose sur le pouvoir diffusant des solutions G/NaCMC**

Pour mieux cerner l'effet de NaCl, CaCl₂ et du glucose, notre choix s'est porté sur les mélanges G/NaCMC à pH 4,2 (**Figure III.44**).

L'ajout de NaCl, CaCl₂ et du glucose au système G/NaCMC ne semble pas augmenter les valeurs du degré de polarisation en comparaison avec celles obtenues pour le mélange seul, ceci se prononce nettement sur les spectres IFR (**Figure III.28**) en se traduisant par des déplacements hypsochromes, ce qui signifie que leur addition conduit à des modifications conformationnelles locales au niveau de la triple hélice. On peut dire que l'effet de la NaCMC prédomine plus sur celui de NaCl, CaCl₂ et du glucose à pH 4,2.

D'une part on a pu aussi constater que les valeurs du degré de polarisation obtenu pour le mélange étaient beaucoup plus élevées que celles de la gélatine seule. Par conséquent on peut dire que l'addition de la NaCMC varie le pouvoir diffusant du milieu. Cette variation du pouvoir diffusant réduit au minimum les modifications conformationnelles de la triple hélice, tout en favorisant le rôle protecteur de la NaCMC sur la gélatine contre la dénaturation en maintenant sa triple hélice plus stable.

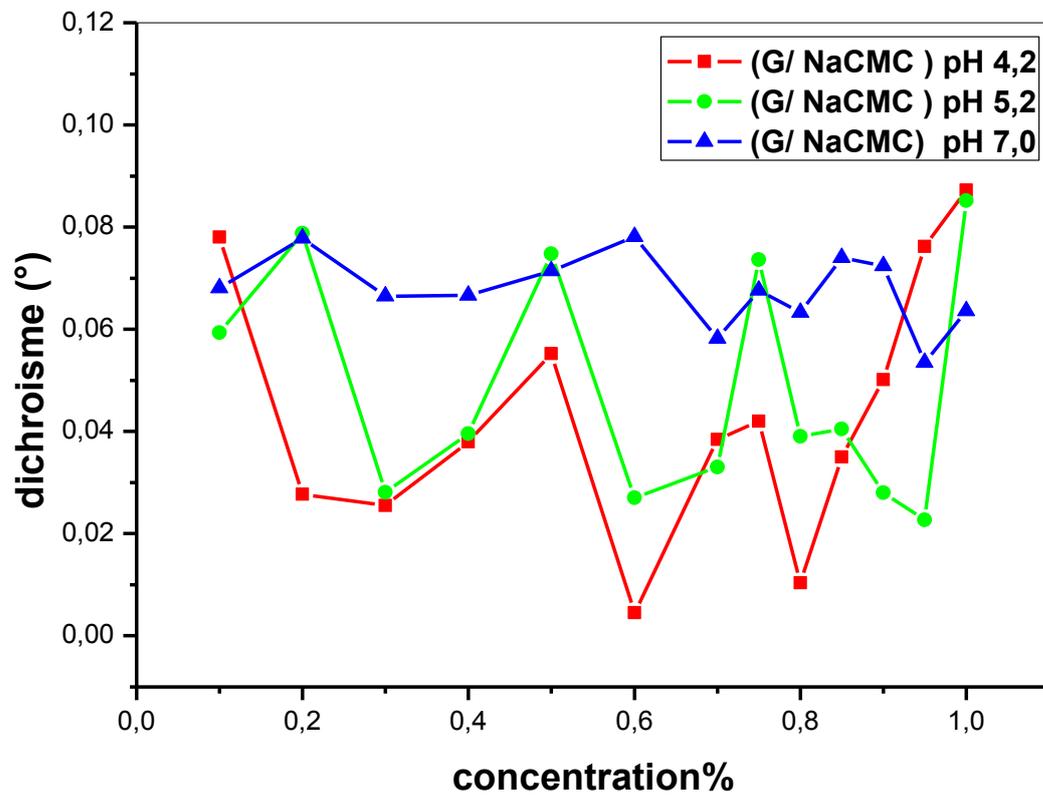


Figure III.42: Evolution du dichroïsme du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

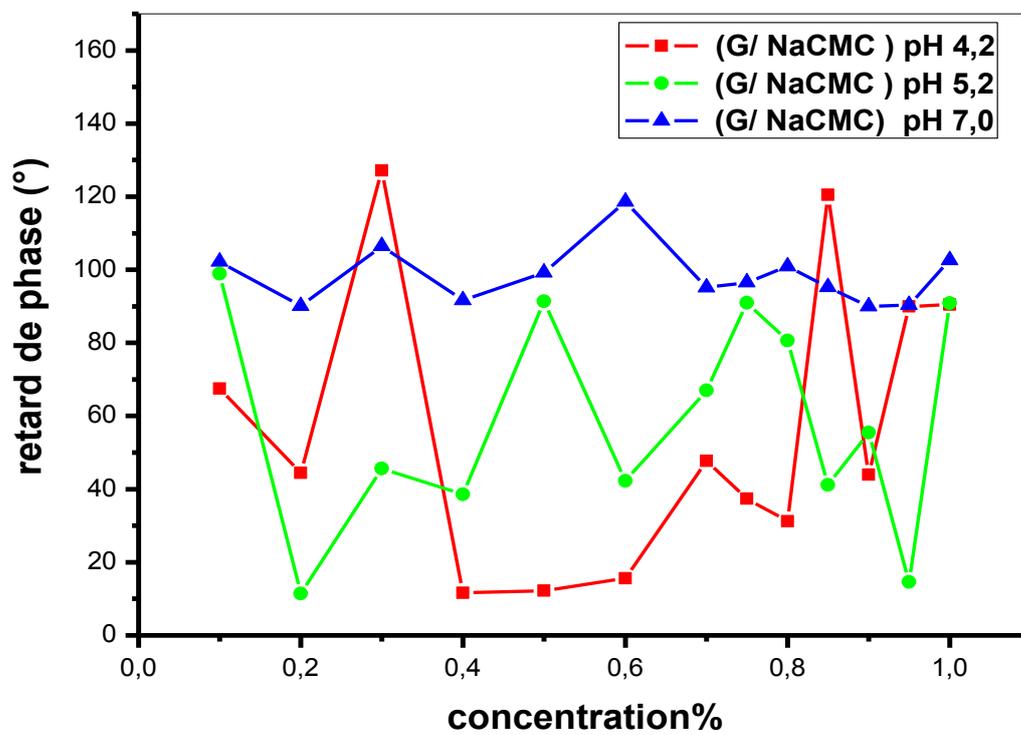


Figure III.43: Evolution du retard du mélange à différents pH en fonction de la concentration.

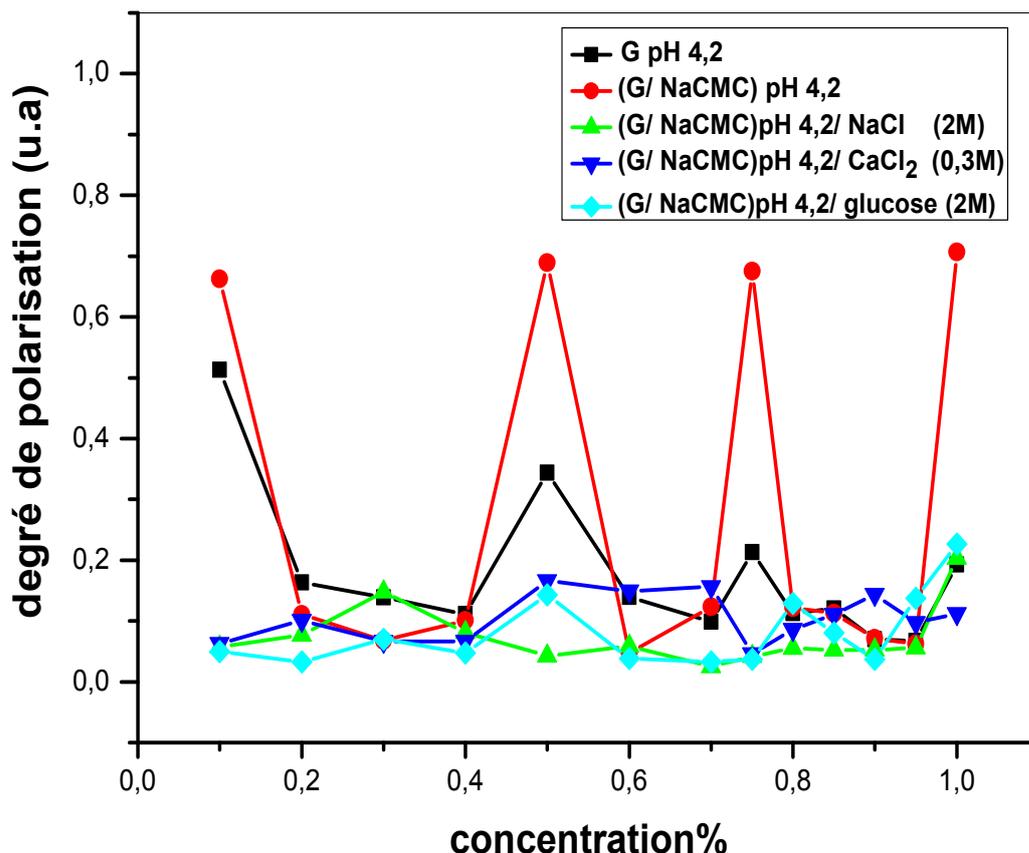


Figure III.44: Evolution du degré de polarisation de la gélatine, du mélange à pH 4,2 en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose en fonction de la concentration.

Ceci n'empêche guère de dire que l'effet de la NaCMC reste toujours prédominant sur celui des autres additifs surtout à pH 4,2. Ceci a été surtout confirmé par UV-Vis, IRTF et polarimétrie.

III-1-8-3. Mesure de l'hélicité de la gélatine par polarimétrie

Dans notre étude pour pouvoir compléter et vérifier les informations structurales fournies par les méthodes spectroscopiques, l'hélicité de la gélatine a été mesurée par polarimétrie. La valeur du pouvoir rotatoire de la gélatine procure des indications sur l'état de la triple hélice et permet de déterminer s'il y a variation dans le taux d'hélicité de la gélatine après complexation avec la NaCMC, changement de pH, variation de la température, et enfin ajout des différents additifs tels le NaCl, CaCl₂ et le glucose.

La gélatine seule possède un pouvoir rotatoire de $(-250^{\circ} \text{ dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3)$ (**Tableau III.8**), la même valeur est observée pour la gélatine à pH 5,2 (**Tableau III.10**) avec un taux d'hélicité

similaire proche de zéro (Jaisson, 2005). Par contre à pH 4,2 et 7,0 le pouvoir rotatoire et le taux d'hélicité sont différents (Tableau III.9 et III.11).

L'effet de la complexation de la gélatine avec la NaCMC fait surtout varier le taux d'hélicité pour le mélange natif ainsi que pour le mélange à différents pH. Ce taux d'hélicité estimé à (100 %) est égal à celui du collagène (Jaisson, 2005), est surtout observé pour le mélange natif (G/NaCMC)_n. On peut dire que l'addition de la NaCMC à la gélatine lui permet de récupérer la totalité de son taux d'hélicité pour la protéger, ceci est en accord avec les résultats observés et confirmés par les méthodes spectrales utilisées dans cette étude.

La perte la plus marquante pour la structure de la triple hélice qui est estimée à 95,44 % ,lors de l'ajout des différents additifs au mélange natif ainsi que pour les mélanges à différents pH, est observée dans plusieurs cas à savoir, le mélange (G/NaCMC)_n/glu (Tableau III.8), (G/NaCMC)_{pH 4,2} /NaCl (Tableau III.9), (G/NaCMC)_{pH 5,2} /CaCl₂ (Tableau III.10) et (G/NaCMC)_{pH 7,0} /CaCl₂ (Tableau III.11), ce qui est en accord avec les résultats trouvés en IRTF qui se traduisent par des déplacements hypsochromes reflétant des modifications conformationnelles importantes de la triple hélice surtout sous l'effet de CaCl₂. Pour confirmer encore une autre fois que le rôle protecteur de la NaCMC est plus prédominant par rapport aux autres additifs.

Tableaux III.8: Les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et le taux de la triple hélice de la gélatine native et du mélange natif en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
G _{native}	-250	4,56
(G/NaCMC) _n	250	100
(G/NaCMC) _n / NaCl	-250	100
(G/NaCMC) _n / CaCl ₂	250	99
(G/NaCMC) _n / glu	-250	4,56

La dénaturation de la gélatine sous l'effet de la température, ne provoque aucune variation du pouvoir rotatoire ni du taux d'hélicité. C'est un résultat attendu car la gélatine est le produit qui résulte de la dénaturation du collagène ayant un taux d'hélicité de 100%, faisant varier celui de la gélatine à des valeurs faibles avoisinantes de 0%, ceci est en accord avec les travaux accomplis par Jaisson (Jaisson, 2005). Ceci est dû probablement à ce que

l'augmentation de la température n'apporte aucune variation significative au taux d'hélicité ni au pouvoir rotatoire de la gélatine dénaturée.

L'effet de la complexation de cette dernière avec la NaCMC provoque une variation importante du taux d'hélicité, c'est à dire une augmentation considérable de la triple hélice, dans ce cas on peut dire que la NaCMC protège aussi la gélatine contre la dénaturation causée par l'augmentation de la température mais d'une manière moins importante en comparaison avec le mélange natif (G/NaCMC)_n (**Tableau III.12**) d'une part.

Tableaux III.9: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 4,2 et du mélange pH 4,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
G _{pH 4,2}	500	100
(G/NaCMC) _{pH 4,2}	250	52
(G/NaCMC) _{pH 4,2} / NaCl	-500	4,56
(G/NaCMC) _{pH 4,2} / CaCl ₂	0	42
(G/NaCMC) _{pH 4,2} / glu	-250	90

Tableau III.10: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 5,2 et du mélange pH 5,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
G _{pH 5,2}	-250	4,56
(G/NaCMC) _{pH 5,2}	0	52
(G/NaCMC) _{pH 5,2} / NaCl	250	100
(G/NaCMC) _{pH 5,2} / CaCl ₂	0	4,56
(G/NaCMC) _{pH 5,2} / glu	500	99

D'autre part la perte de la triple hélice est considérable pour le mélange dénaturé en présence d'additifs, surtout lors de l'ajout de CaCl₂ (**Tableaux III.12-13 et III.15**) ce qui a été aussi remarqué pour le cas du mélange natif.

Tableaux III.11: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine pH 7,0 et du mélange pH 7,0 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
G _{pH 7,0}	250	99
(G/NaCMC) _{pH 7,0}	0	99
(G/NaCMC) _{pH 7,0} / NaCl	-500	99
(G/NaCMC) _{pH 7,0} / CaCl ₂	-250	4,56
(G/NaCMC) _{pH 7,0} / glu	0	52

Tableaux III.12: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée et du mélange en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
Gd	-250	4,56
Gd/NaCMC	-750	42
Gd/NaCMC / NaCl	0	100
Gd/NaCMC / CaCl ₂	-250	4,56
Gd/NaCMC/glu	250	99

Tableaux III.13: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 4,2 et du mélange pH 4,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
Gd _{pH 4,2}	-250	4,5
(Gd/NaCMC) _{pH 4,2}	-250	42
(Gd/NaCMC) _{pH 4,2} / NaCl	-250	52
(Gd/NaCMC) _{pH 4,2} / CaCl ₂	250	4,56
(Gd/NaCMC) _{pH 4,2} / glu	0	42

Tableaux III.14: Valeurs du pouvoir rotatoire spécifique et du taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 5,2 et du mélange pH 5,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
Gd	0	52
(Gd/NaCMC) _{pH 5,2}	-250	4,5
(Gd/NaCMC) _{pH 5,2} / NaCl	-250	99
(Gd/NaCMC) _{pH 5,2} / CaCl ₂	250	52
(Gd/NaCMC) _{pH 5,2} / glu	250	52

Tableaux III.15: Valeurs de pouvoir rotatoire spécifique et le taux de la triple hélice de la gélatine dénaturée pH 7,0 et du mélange pH 7,0 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

Composition	$[\alpha]_{\lambda}$	Taux de la triple hélice %
Gd	0	52
(Gd/NaCMC) _{pH 7,0}	0	99
(Gd/NaCMC) _{pH 7,0} / NaCl	0	100
(Gd/NaCMC) _{pH 7,0} / CaCl ₂	-250	4,56
(Gd/NaCMC) _{pH 7,0} / glu	0	52

III-1-9. Etude morphologique du mélange G/NaCMC en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose

L'analyse par microscopie (AFM) a permis d'acquérir des informations utiles sur les microstructures formées suite au changement de pH et l'ajout de NaCMC, NaCl, CaCl₂ et du glucose à la gélatine.

Les films de la gélatine native ont été préparés à partir d'une solution de gélatine à température ambiante dans de l'eau, donc elle va subir un prétraitement avec de l'eau. Les microstructures de la gélatine native qui se distinguent par AFM suite à ce prétraitement aqueux sont présentées dans la **Figure III.46**.

La gélatine native préparée dans l'eau montre des agrégats distincts avec la présence aussi de pores annulaires (**Figure III.46**). Ces derniers n'ont pas été observés dans le cas de la gélatine prétraitée par l'eau et l'acide. Par contre, leur présence a été confirmée dans le cas de la gélatine qui a subi uniquement un prétraitement alcalin dans des travaux réalisés par (**Hongshun et al., 2008**).

Auparavant, il a été signalé que la gélatine qui a subi un prétraitement acide suivi d'un prétraitement alcalin, montre des structures semblables (présence de pores annulaires), la raison qui a été suggérée et que les solutions acides et alcalines pénètrent d'une manière inégale dans les molécules de la gélatine (Yang *et al.*, 2007). Les dimensions des pores annulaires rapportées dans le **Tableau III.16** sont supérieures à celles trouvées par (Haugstad *et al.*, 1993) qui se situent dans la gamme de 10 à 100 nm (voir annexe A4). La taille des pores de la gélatine est importante pour son application surtout dans l'industrie photographique et plus particulièrement dans cette gamme (Haugstad *et al.*, 1993).

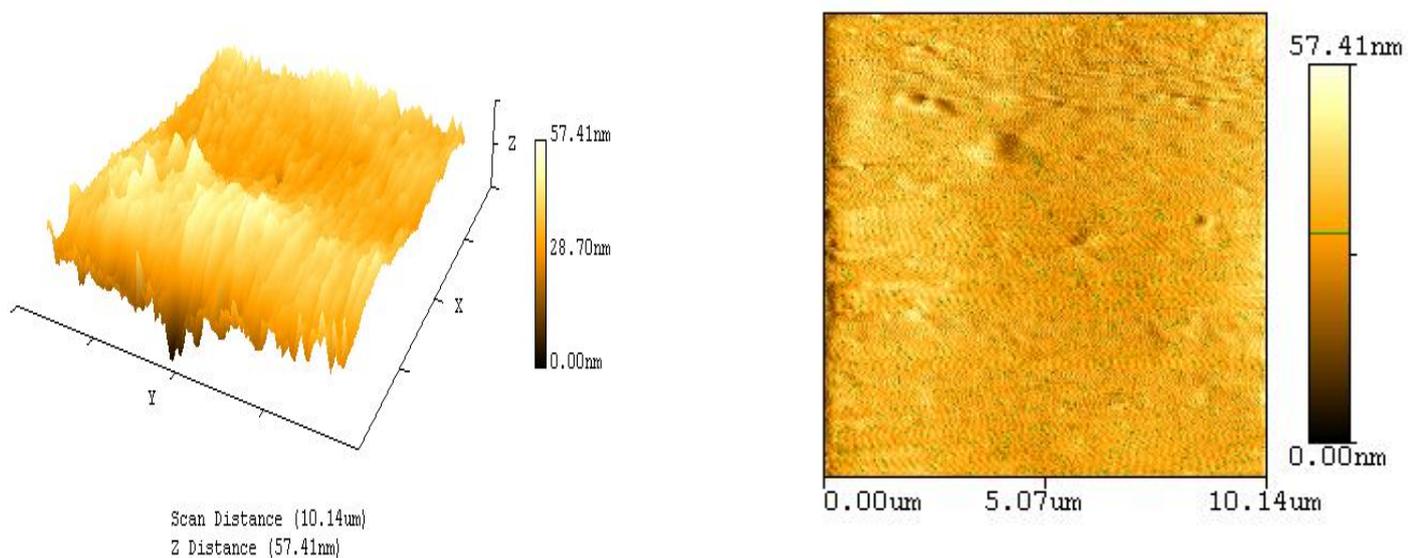


Figure III.46: Images par AFM de la gélatine native.

➤ Effet de la concentration sur les microstructures

Les films à base de gélatine native préparés à une faible concentration 0.1% (Figure III.46), montrent des agrégats, ceci est en accord avec les travaux réalisés par (Hongshun *et al.*, 2008) qui proposent que la gélatine de concentration élevée (1% à 6,67%) avait une structure fibreuse, mais pour une concentration faible la morphologie structurale se présente sous forme d'agrégats sphériques. D'après (Hongshun *et al.*, 2008) la concentration est considérée comme l'un des facteurs qui détermine la forme du réseau une fois que la protéine sera complexée.

Afin de comprendre les structures formées pendant le processus d'interaction d'une manière plus approfondie, une image par AFM a été prise pour la NaCMC seule qui montre une

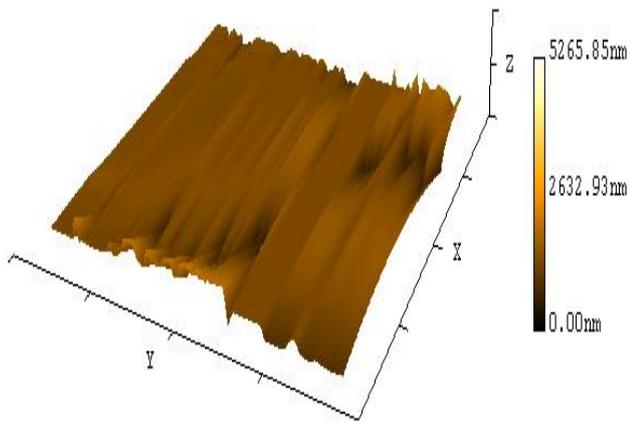
topographie en relief (**Figure III.47**) avec une rugosité moyenne de ($R_a = 117,25$ nm) et une rugosité arithmétique moyenne de ($R_q = 201,14$ nm) (**voir annexe A4**), en comparaison avec celles de la gélatine qui sont d'ordre faible et qui sont respectivement de R_a (4,25 nm) et R_q (5,60 nm) (**voir annexe A4**).

L'image par AFM du film G/NaCMC (**Figure III.48**) est bien similaire avec le réseau moléculaire mis en évidence par (**Morris et al., 1999, Farris et al., 2011**). Des structures fibreuses apparaissent. Le nombre de fibres augmente au détriment des agrégats et des pores annulaires préalablement observés pour la gélatine seule pour donner un assemblage en réseau fibreux qui est similaire au processus de gélification avec le temps réalisé dans les travaux de (**Mackie et al., 1998**).

L'évaluation morphologique des agrégats et des structures fibreuses était aussi cohérente avec les observations faites par (**Saxena et al., 2005**).

L'addition de la NaCMC à la gélatine conduit à un comportement différent (**Figure III.48**), qui a révélé que les agrégats et les pores annulaires disparaissent pour céder la place à une structure fibreuse plus homogène, il semble que la NaCMC donne la possibilité à la gélatine pour récupérer la conformation originale de sa triple hélice, tout en favorisant la formation d'un réseau binaire entre la gélatine et la NaCMC (**Farris et al., 2011**). L'image AFM confirme en effet une incompatibilité prouvant l'existence d'une interaction (associative ou ségrégrative) entre les deux biopolymères et qui a été confirmé par les différentes méthodes spectrales utilisées dans cette étude, ce qui génère une surface plus rugueuse, surtout en comparaison avec l'image AFM du film de la gélatine seule (**Figure III.46**), avec augmentation de R_a et R_q qui sont respectivement (8,30 nm) et (10,32 nm) (**voir annexe A4**).

Comme l'ont déjà signalé (**Dautzenberg et al., 2002**), l'effet de la densité de charge (qui peut être géré par le pH du système) sur la stabilité des complexes du polyélectrolyte, doit être contrôlé. Dans notre système l'équilibre de charge qui est contrôlé par le ratio des polyélectrolytes (1 : 1) dans la dispersion mixte entre la gélatine et la NaCMC, joue un rôle essentiel pour avoir un réseau réparti uniformément.



Scan Distance (80.33um)
Z Distance (5265.85nm)

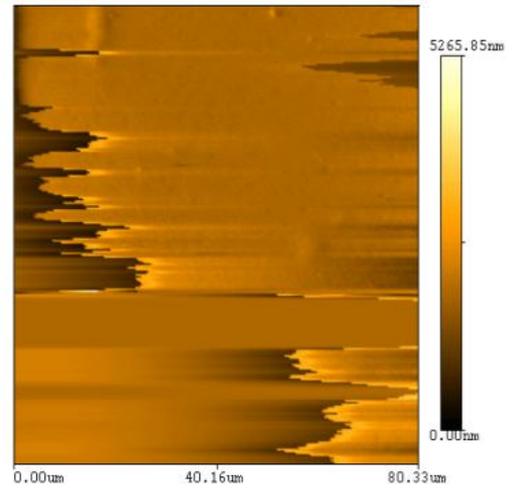
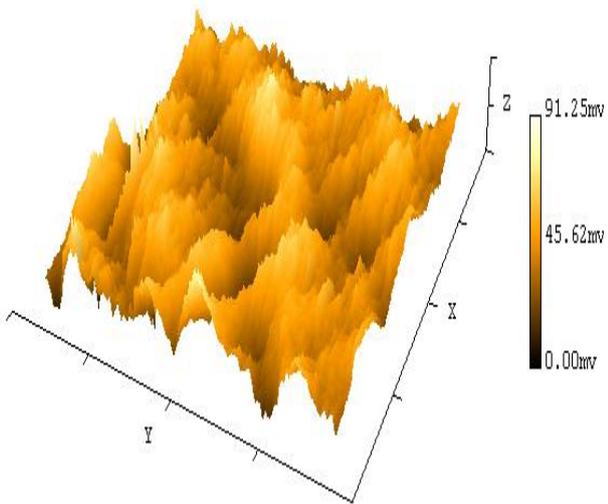


Figure III.47: Images par AFM de la NaCMC native.



Scan Distance (20.28um)
Z Distance (91.25mV)

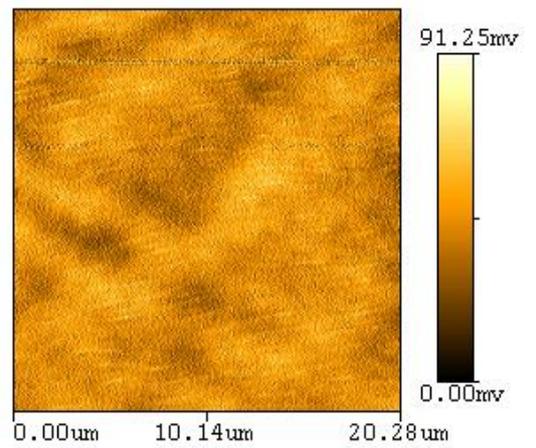


Figure III.48: Images par AFM du mélange (G/NaCMC)_n.

Tableau III.16: Différentes dimensions des microstructures calculées par AFM pour la gélatine et les différents mélanges.

Dimension	Diamètre des pores annulaires (μm)	Diamètre des agrégats (μm)	Diamètre des coacervats (μm)
Gnative	0,864	1,892	
	0,818	1,168	
	0,584	0,771	
G/NaCl		1,809	1,094
		1,119	1,476
		1,023	
(G/NaCMC)/NaCl		1,916	0,537
		1,258	0,724
		1,635	0,888
(G/NaCMC)_{pH4.2}		1,577	
		1,091	
		2,779	
		2,704	
		1,886	
		2,103	
(G-NaCMC)_{pH4.2}/NaCl		1,047	1,313
(G-NaCMC)_{pH4.2}/glucose		1,532	1,785
			1,951
			1,568

Pour pouvoir suivre l'effet des sels (NaCl, CaCl₂) et du glucose ajoutés au mélange natif, nous allons illustrer l'effet de chacun d'eux.

➤ **Effet de l'ajout de NaCl**

Lors de l'ajout de NaCl à la gélatine, les films préparés montrent des coacervats, avec une grande hétérogénéité (sans structures géométriques définies) dans certaines régions et avec aussi apparition d'agrégats dans d'autres parties.

(Lin et al., 2002) ont proposé que l'agrégation de la gélatine s'est produite comme étant une association multimérique (ou association de clusters) processus où les multimères de toute taille peuvent former des structures de cluster qui vont ensuite s'associer davantage en agrégats sphériques d'une part (**Figure III.49**).

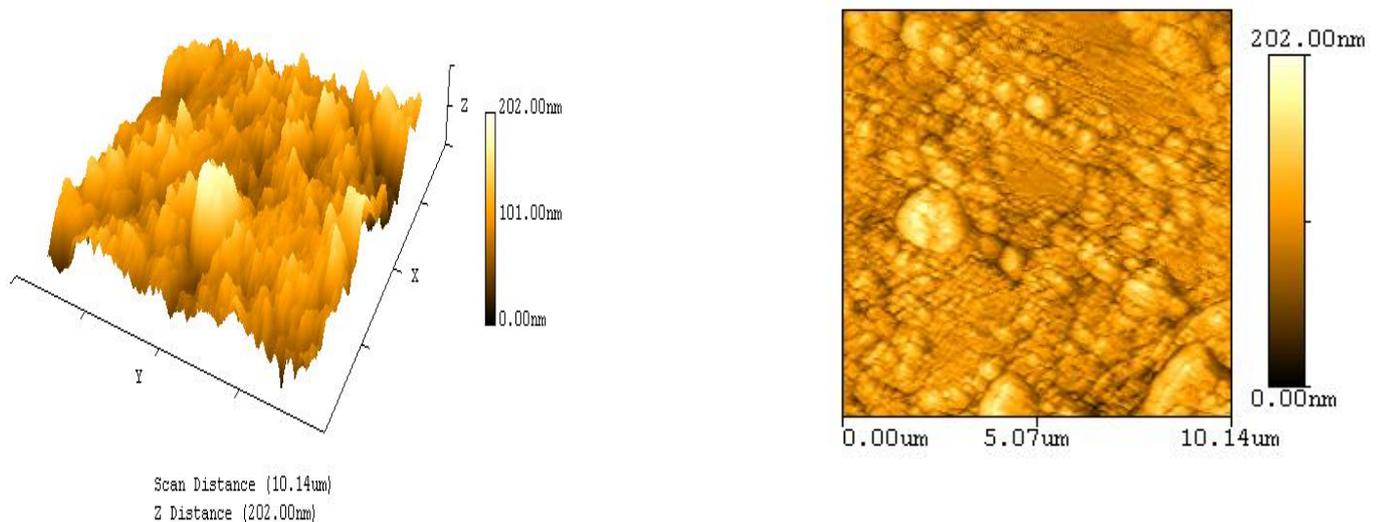


Figure III.49: Images par AFM du mélange (G_n/NaCl).

D'autre part, l'addition simultanée de la NaCMC et du NaCl à la gélatine montre une diminution de la taille des coacervats (**Tableau III.16**). Du point de vue rugosité (Ra = 16,26 nm) et (Rq = 21,96 nm) (**voir annexe A4**), les films à base de G/NaCl présentent des valeurs élevées en comparaison au film (G/NaCMC/NaCl) (**Figure III.50**) ayant des valeurs (Ra = 7,40 nm et Rq = 9,45 nm) (**voir annexe A4**), mais ces dernières valeurs sont moins élevées que les valeurs attribuées au mélange natif (G/NaCMC) (Ra = 8,30 nm et Rq = 10,32 nm). On peut déduire que l'ajout simultané de NaCMC et NaCl à la gélatine donne des films moins rugueux en s'appuyant sur les valeurs des deux rugosités, prouvant à nouveau que l'interaction qui existe dans le mélange (G/NaCMC)_n est plus importante que l'interaction

présente dans le mélange $(G/NaCMC)_n/NaCl$ favorisant ainsi le rôle protecteur de la NaCMC vis à vis de la gélatine contre la dénaturation.

➤ **Effet de l'ajout de $CaCl_2$**

L'ajout de $CaCl_2$ au mélange natif donne un film dont la topographie par AFM est identique à celle du film à base de NaCMC seule, mais avec ($R_a = 3,08$ nm et $R_q = 5,16$ nm) (voir **annexe A4**) notamment très faibles en comparaison à celles de NaCMC ($R_a = 117,25$ nm et $R_q = 201,14$ nm), avec apparition de rares coacervats. Ces changements sont indicatifs d'un grand désordre dans la gélatine qui est associé probablement à la perte de la triple hélice, qui s'est traduite en IRTF par la disparition de l'amide III (**Figure III.51**).

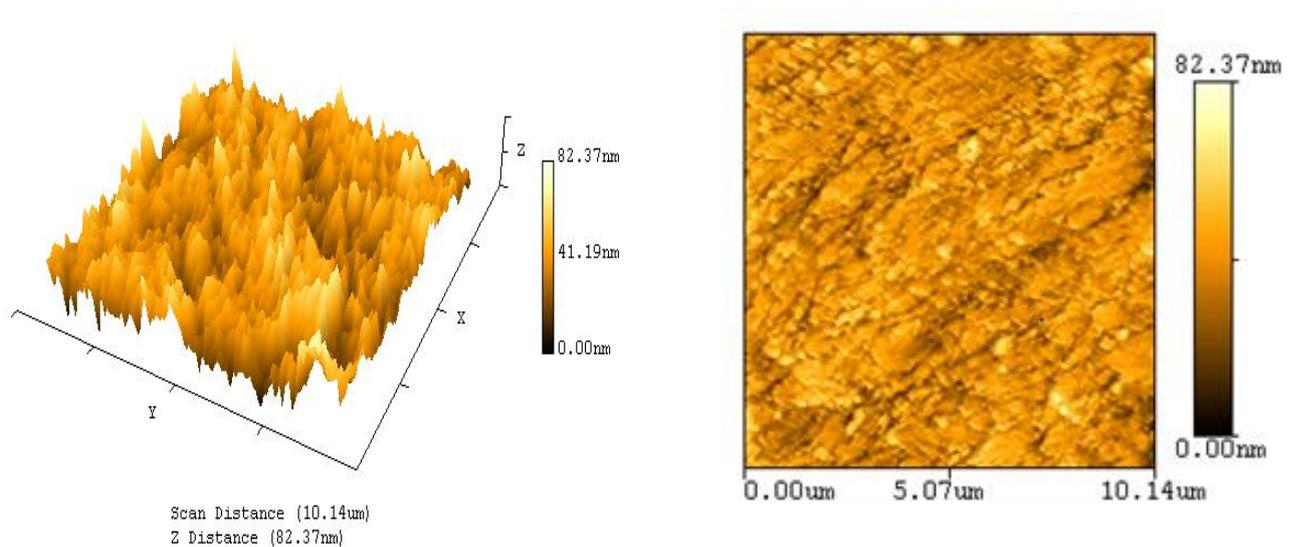


Figure III.50: Images par AFM du mélange $(G/NaCMC)_n/NaCl$.

➤ **Effet de l'ajout du glucose**

Le profil AFM (**Figure III.52**) suite à l'addition du glucose a mis en évidence une distribution uniforme de petits agrégats presque globulaires, ils sont nombreux et trop rugueux, ceci a été confirmé par l'ensemble des valeurs des paramètres de surface ($R_a = 10,77$ nm, $R_q = 15,89$ nm et $R_z = 244,60$ nm), en comparaison à l'addition de NaCl et $CaCl_2$. L'interaction entre les deux biopolymères est plus significative en présence du glucose qu'en présence des sels. Ceci concorde avec les résultats de DRX, se traduisant par la réapparition du premier pic aux environs de 9° .

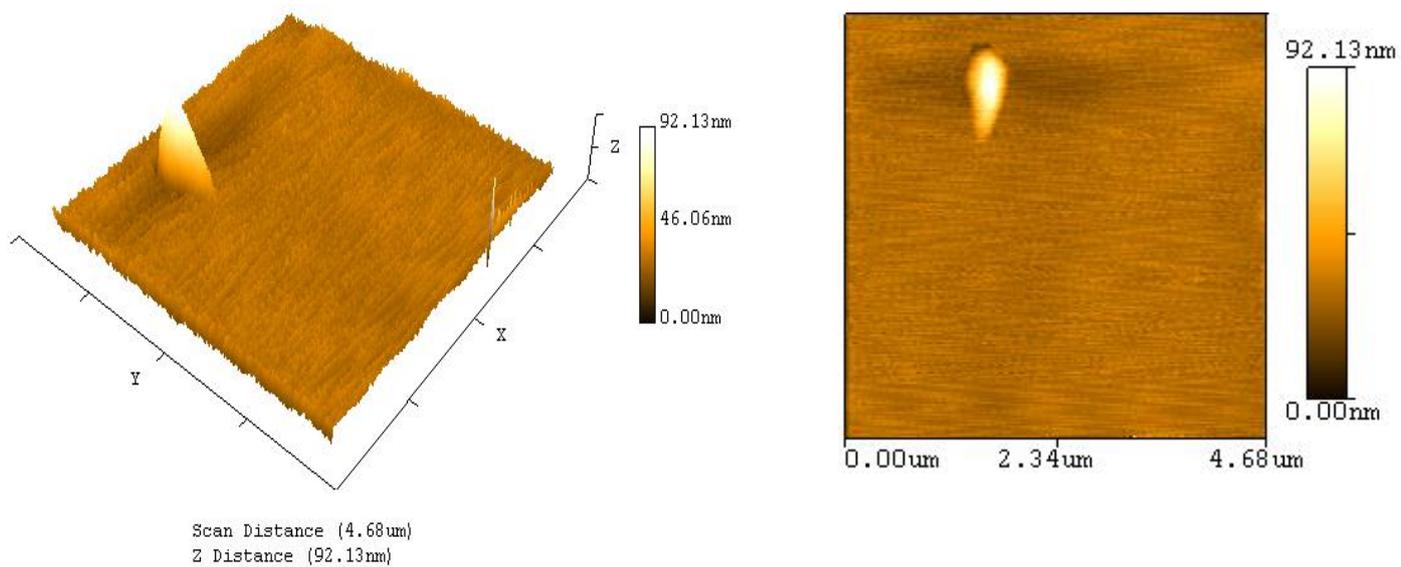


Figure III.51: Images par AFM du mélange $(G/NaCMC)_n / CaCl_2$.

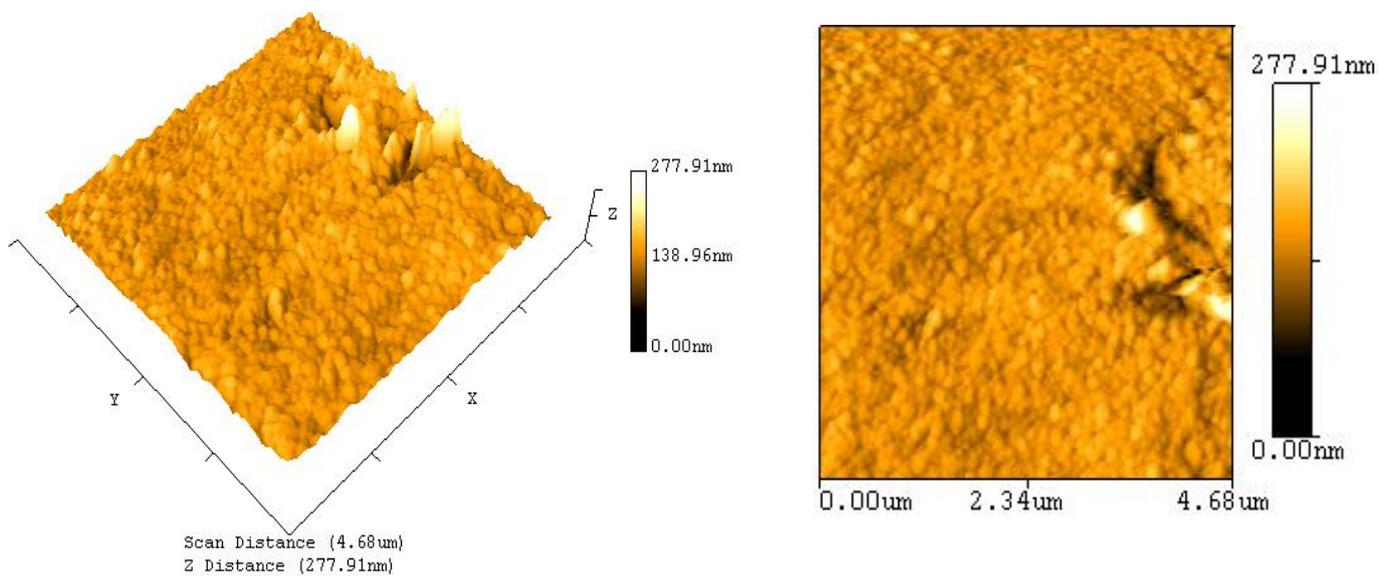


Figure III.52: Images par AFM du mélange $(G/NaCMC)_n / \text{glucose}$.

➤ Effet dû au changement de pH

La solution de la gélatine native a été ajustée à un pH 4,2 (HCl 0,6N) pour qu'on soit sur de travailler avec des protéines natives et solubles. Les films de gélatine ayant un pH 4,2 suite à ce prétraitement acide, leur image AFM montrent la présence de microagrégats dans certaines régions et des structures fibrillaires dans d'autres, avec l'existence de rares coacervats (**Figure III.53**). Les coacervats qui coexistent avec les structures fibreuses sont très semblables à ceux observés pour une gélatine de porc traitée par l'acide (**Uricanu *et al.*, 2003**) et aussi la gélatine qui a subi un prétraitement alcalin (**Mohanty *et al.*, 2005**).

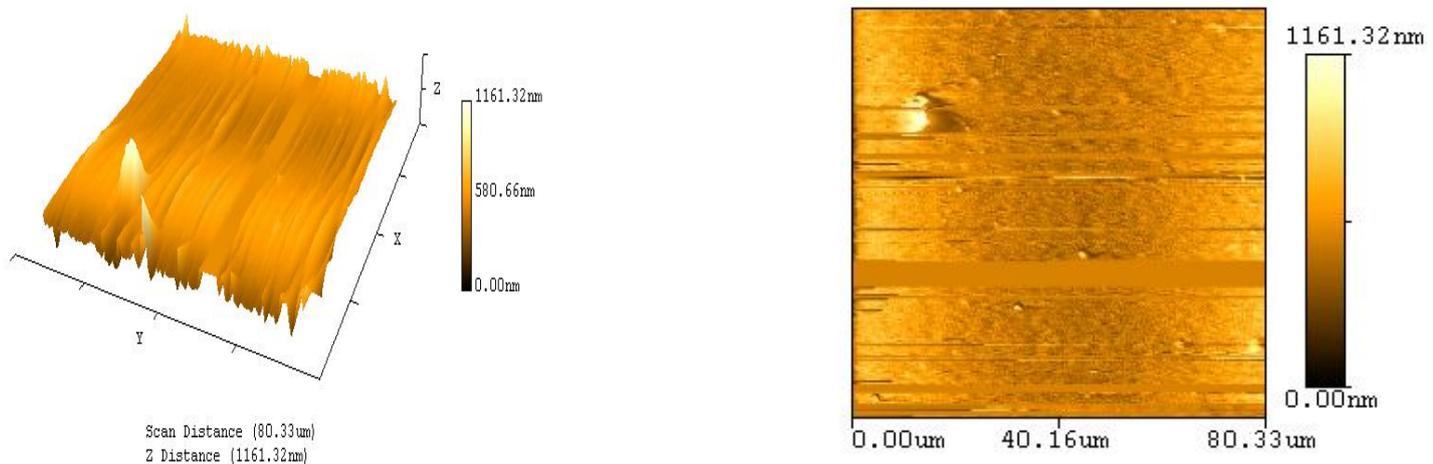


Figure III.53: Images par AFM de la gélatine à pH 4.2 ($G_{\text{pH } 4.2}$).

On sait bien que la gélatine est un polyélectrolyte de densité de faible charge, avec une nette charge sensiblement dépendante du pH de la solution. Depuis la formation de microparticules par désolvation est un processus de neutralisation auto-charge; (les segments chargés positivement chevauchent sur les segments chargés négativement de la même chaîne en raison des interactions de coulomb provoquant la neutralisation des charges), la taille effective des microparticules est dépendante du pH. La longueur typique persistante (**Pezeron *et al.*, 1991**) de la gélatine est 2 nm qui donne suffisamment de souplesse pour les segments chargés positivement à chevaucher (à la fois inter et intra) sur les segments chargés négativement par de nouvelles interactions électrostatiques tout en favorisant la formation ultérieure de microagrégats.

Le changement de pH de la solution de gélatine native (pH = 5,13) à un pH acide 4,2 provoque l'augmentation des valeurs de Ra et Rq, qui deviennent respectivement (Ra = 49,83

nm) et ($R_q = 73,41$ nm) (**voir annexe A4**) en comparaison avec celles des films à base de gélatine native ($R_a = 4,25$ nm) et ($R_q = 5,66$ nm) avec apparition de microagrégats (**Figure III.53**). Ce résultat est en accord avec les travaux de (**Pezeron *et al.*, 1991**) déjà décrits.

Le complexe G/NaCMC qui a subi un changement de pH a été aussi étudié, l'image par AFM montre des fragments avec une immense hétérogénéité, n'ayant pas de structures géométriques bien définies (**Mohanty *et al.*, 2005**). La différence importante de la taille est due au changement de pH en comparaison avec le mélange natif, ceci montre que la protonation ou la déprotonation des résidus des acides aminés et carboxyliques dans les molécules de gélatine, a un effet sur le comportement des molécules de gélatine ainsi que sur la forme et la taille des fragments constitués (**Saxena *et al.*, 2005**).

Il faut savoir aussi que les molécules de gélatine ne portent pas de segments chargés positivement et négativement à tous les pHs. Ceci ne change pas l'image globale de l'interaction, il n'affecte que le degré de neutralisation de la charge dans une solution spécifique. Un tel processus va naturellement donner lieu à une solution polydispersée de nanoparticules de gélatine. Cela est évident dans l'image AFM (**Figure III.54**) suite à l'apparition des particules de gélatine en présence de NaCMC à pH = 4,2. Le changement de pH de l'état natif (pH = 5,13) à pH = 4,2 a un effet remarquable sur la taille des particules. Il a été constaté qu'à pH 4.2 le nombre et la taille des particules augmente en comparaison avec celles du mélange natif. L'augmentation ou la diminution du pH provoque des charges positives ou négatives nettes dûent à l'ionisation des groupes COOH et NH₂ respectivement.

➤ **Effet additionnel dû au changement du pH et l'ajout des sels (NaCl, CaCl₂) et du glucose**

Les profils AFM, (**Figure III.57**) ont mis en évidence une distribution uniforme d'agrégats, qui coexistent avec la présence de quelques coacervats, plus particulièrement dans le cas du glucose. Les films obtenus sont trop rugueux, ceci a été prouvé par l'ensemble des valeurs des paramètres de surface élevées ($R_a = 55,13$ nm, $R_q = 76,82$ nm et $R_z = 400,70$ nm) (**voir annexe A4**) surtout dans le cas du glucose, dont les mêmes constatations ont été faites pour le mélange natif ($R_a = 10,77$ nm, $R_q = 15,89$ nm et $R_z = 244,60$ nm). Les résultats indiquent que le pH influence la structure des microstructures formées ainsi que les valeurs des paramètres de surface des différents films préparés beaucoup plus que la force ionique (NaCl, CaCl₂) et le glucose (**Figure III.55**) et (**Figure III.56**).

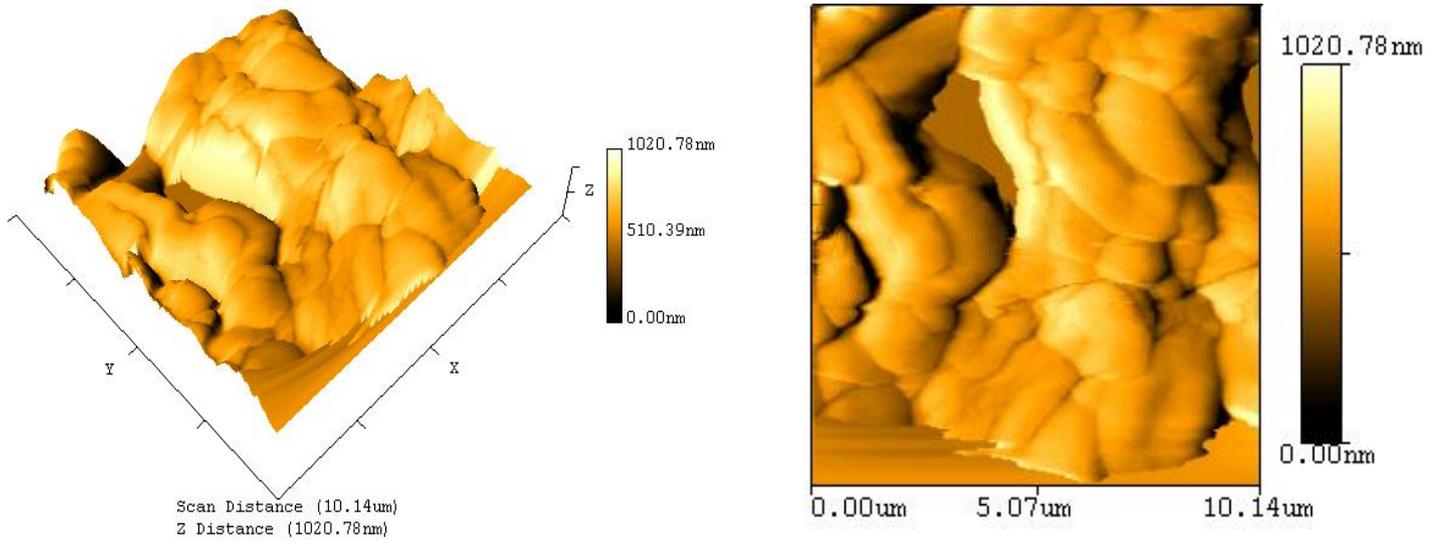


Figure III.54: Images par AFM du mélange (G/NaCMC) $\text{pH } 4.2$.

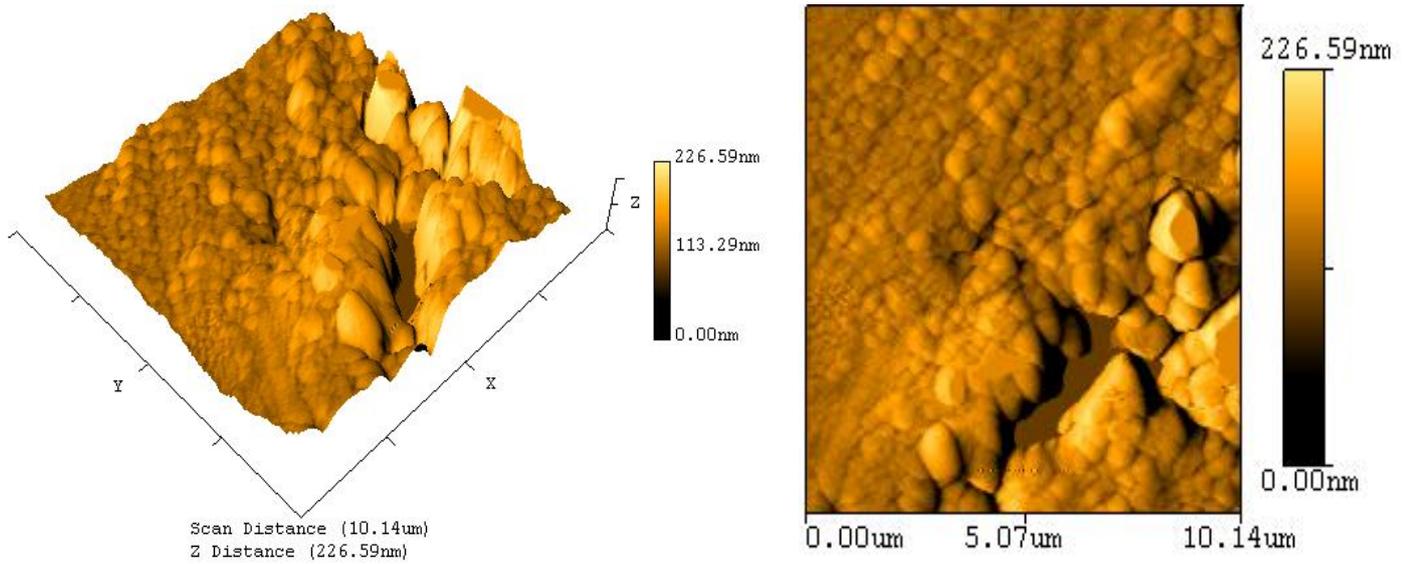


Figure III.55: Images par AFM du mélange (G/NaCMC) $\text{pH } 4.2/\text{NaCl}$.

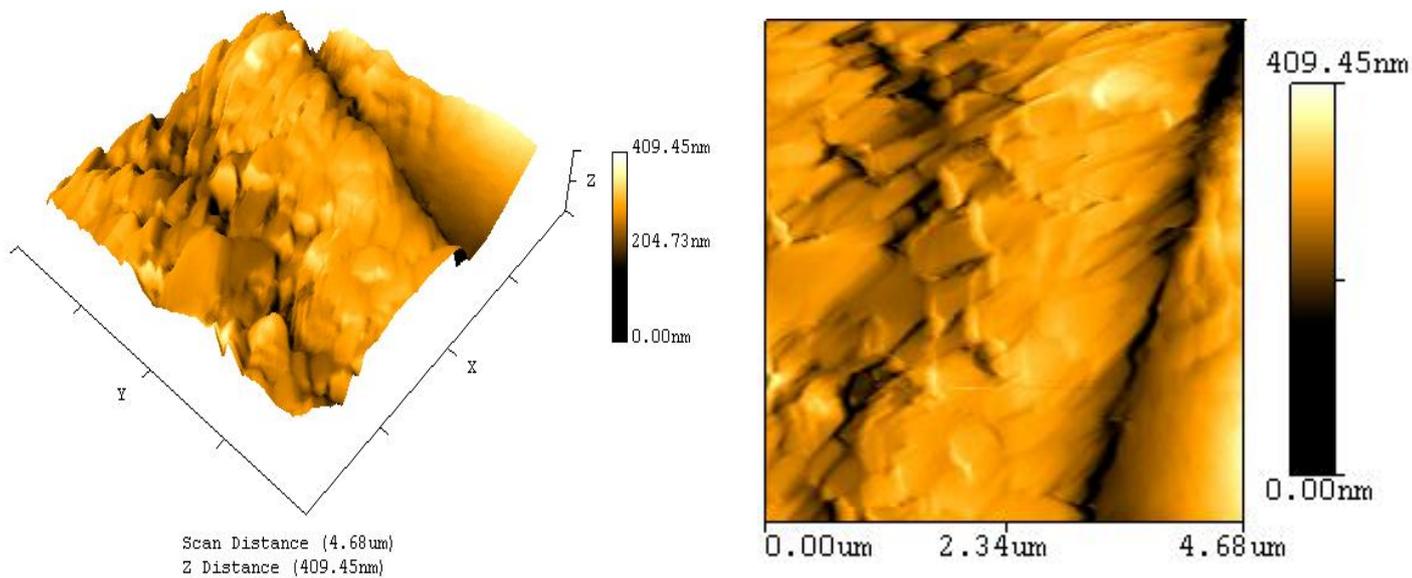


Figure III.56: Images par AFM du mélange (G/NaCMC) $\text{pH } 4.2/\text{CaCl}_2$.

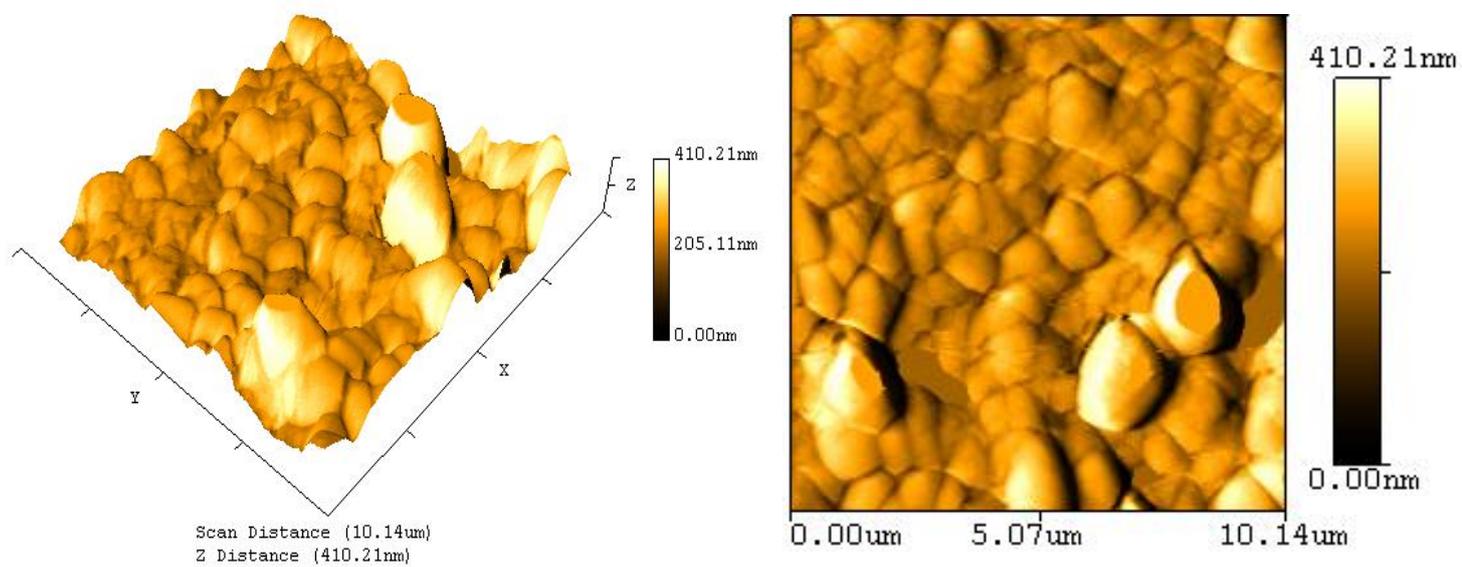


Figure III.57: Images par AFM du mélange (G/NaCMC) $\text{pH } 4.2/\text{glucose}$.

CONCLUSIONS

Malgré de nombreuses études portant sur la gélatine son comportement en solution est encore difficile à prédire, puisqu'il varie significativement selon les autres substances présentes dans son environnement. Pour cela nous nous sommes attachés, dans ce présent travail à étudier l'influence du pH (4,2, 5,2 et 7,0) qui a un effet sur la formation des complexes d'une part, et d'autre part d'étudier le comportement de la gélatine en présence de NaCMC, NaCl, CaCl₂, et du glucose, ainsi que de caractériser le comportement du mélange Gélatine/NaCMC en absence et en présence de ces additifs. Dans le but de comprendre les interactions qui entrent en jeu et en même temps suivre l'évolution du taux d'hélicité de la triple hélice de la gélatine, des caractérisations spectrales et microscopiques ont été réalisées.

Dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution de l'absorbance par UV-Vis qui a révélé que pour le système gélatine/NaCMC, l'augmentation de la concentration en protéine a pour effet d'augmenter l'absorbance d'une manière générale. Cette augmentation est plus remarquable à pH 4,2 pour un ratio 1 : 1, par contre elle est moindre à pH 5,2 et 7,0 respectivement.

L'étude par spectrophotométrie UV-Vis a aussi montré que l'effet de la NaCMC semble prédominer sur celui des autres substances présentes dans l'environnement de la gélatine telles que le NaCl, CaCl₂ et le glucose, se traduisant par augmentation de l'absorbance.

Dans un second temps, une étude sur l'évolution de la mobilité électrophorétique pour le mélange G/NaCMC a été entreprise, montrant que lorsque le ratio est en faveur de la protéine les électrophérogrammes subissent des modifications importantes plus particulièrement pour le ratio (4 :1) reflétant une interaction maximale entre la gélatine et la NaCMC. Ceci concorde avec les résultats obtenus par UV-vis qui révèlent qu'une interaction maximale entre les biopolymères étudiés est obtenue pour ce même ratio pour une concentration totale en biopolymères de 0,75 wt%.

L'élaboration **des** diagrammes de phase a révélé qu'une séparation de phase à pH 4,2 n'est survenue qu'à une concentration supérieure à 0,6%, par contre à pH 5,2 et 7,0 elle a été observée à toutes les concentrations d'une manière générale.

L'analyse par IRTF confirme que le changement de pH de la gélatine native mène à un déplacement hyposochrome de l'amide I notamment à pH 5,2 et pH 7,0 et conduit aussi à la variation de l'intensité de l'amide III, qui est associé à la triple hélice. Le déplacement

bathochrome de la bande maximale de la NaCMC est dû à l'implication de ce dernier dans la complexation d'une part.

Le suivi de l'influence du pH sur le phénomène de complexation de la gélatine avec la NaCMC fait apparaître plusieurs changements dans les spectres dans la gamme de pH étudiés (4,2-7,0), qui se prononcent avec des déplacements hypsochromes surtout à pH 5,2 et pH 7,0. Cependant ces déplacements des bandes sont associés à la structure de l'hélice α . Ces modifications mènent à conclure que la structure de l'hélice α est atteinte par le changement de pH aussi bien pour le cas de la gélatine seule, que pour la gélatine complexée avec la NaCMC. D'autre part, on a noté aussi que la bande de l'amide III est presque inexistante surtout sous l'effet de CaCl_2 à ces deux pH, ce changement est indicatif d'un grand désordre dans la gélatine qui est associé à la perte de la triple hélice.

Par ailleurs, La diffraction des rayons X a montré que l'addition de la NaCMC induit la disparition du premier pic. Ce phénomène de diminution ou bien disparition de ce dernier correspond à une diminution du diamètre inter réticulaire de la triple hélice qui est directement lié au taux d'hélicité de la gélatine. L'ajout de CaCl_2 suivi par cette méthode, cause aussi la diminution du taux d'hélicité ce qui est en accord avec l'IRTF.

L'analyse polarimétrique confirme que l'addition de la NaCMC à la gélatine varie le pouvoir diffusant du milieu, ce qui révèle qu'une interaction significative s'est instaurée entre les deux biopolymères. Ces interactions sont des forces électrostatiques gouvernant le processus de complexation.

D'autre part l'ajout de NaCl , CaCl_2 et du glucose au système G/NaCMC ne semble pas augmenter les valeurs du degré de polarisation en comparaison avec celles obtenues pour le mélange seul, ceci se prononce nettement sur les spectres IRTF par des déplacements hypsochromes, ce qui signifie que leur addition conduit à des modifications conformationnelles locales au niveau de la triple hélice. On peut dire que l'effet de la NaCMC prédomine plus sur celui de NaCl , CaCl_2 et de glucose surtout à pH 4,2, car son addition minimise au maximum ces modifications conformationnelles, tout en favorisant le rôle protecteur de la NaCMC sur la gélatine contre la dénaturation en maintenant sa triple hélice plus stable.

Pour pouvoir compléter et vérifier les informations structurales fournies par les méthodes spectrales utilisées dans cette étude, l'hélicité de la gélatine a été aussi mesurée par polarimétrie, l'effet de la complexation de la gélatine étudiée par cette méthode fait surtout

varier le taux d'hélicité pour le mélange natif ainsi que pour le mélange à différents pH. La perte la plus marquante pour cette hélice est observée aussi sous l'effet de CaCl_2 .

Enfin une analyse morphologique a été entreprise par microscopie AFM qui montre que la gélatine présente des pores qui coexistent avec des agrégats. L'addition de la NaCMC conduit à un comportement différent, qui a révélé que les agrégats et les pores annulaires disparaissent pour céder la place à une structure fibreuse plus homogène. En particulier, il semble que la NaCMC donne la possibilité à la gélatine pour récupérer la conformation originale de la triple hélice, tout en favorisant la formation d'un réseau binaire entre la gélatine et la NaCMC. L'étude morphologique par AFM confirme aussi une incompatibilité prouvant l'existence d'une interaction (associative ou ségrégative) entre les deux biopolymères et qui a été confirmé par les différentes méthodes spectrales utilisées dans cette étude, ce qui génère une surface plus rugueuse, surtout en comparaison avec l'image par AFM du film de la gélatine, se traduisant par l'augmentation de R_a et R_q .

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Scher, J., and Sanchez, C. (2010). Thermodynamic characterization of Acacia gum- β -lactoglobuline complex coacervation. *Langmuir*, 26 (15), 12523-2533.

Albertsson, P. A. (1971). Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2^{ème} édition, New York : Wiley Interscience.

Allain, A. F., Paquin, P., and Subirade, M. (1999). Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biological. Macromolecules*, 26, 337-344.

Anal, A.K., and Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251.

Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., Galicia-García, T., Martínez-Bustos, F., and Grosso, C. R. F. (2011). Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal of Food Engineering*, 103, 1296136.

Antonov, Y. A., Lashko, N. P., Glotova, Y., Malovikova, A., and Markovich, O. (1996). Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. *Food Hydrocoll*, 10, 1-9.

B

Baigl, D. (2003). Etude expérimentale de polyélectrolyte hydrophobe modèle, Thèse de Doctorat de l'université de Paris.

Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochim Biophys. Acta*, 1120, 123-143.

Baumy, J. J., and Brulé, G. (1988). Binding of cations to α -lactalbumin et β -lactoglobulin: effet of pH and ionic strength. *Le Lait*, 68, 33-48.

Bejenariu, A., Popa, M., Dulong, V., Picton, L., and Le Cerf, D. (2009). Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polymer Bulletin*, 62, 525-538.

Benichou, A., Aserin, A., and Garti, N. (2002). Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, 93-123.

- Benichou, A., Aserin, A., and Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294, 20-32.
- Benshitrit, R. C., Levi, C. S., Tal, S. L., Shimoni, E., & Lesmes, U. (2012). Development of oral food-grade delivery systems: current knowledge and future challenges. *Food and Function*, 3, 10-21.
- Berand, J. (2001). Le technicien d'analyses biologiques; guide théorie et pratique, 2^{ème} édition, Tec & Doc, Paris, 177 p.
- Bergfeldt, K., Piculell, L., and Linse, P. (1996). Segregation and association in mixed polymer solutions from Flory-Huggins model calculations. *Journal of Physical Chemistry*, 100, 3680-3687.
- Bergo, P., and Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1285-1289.
- Bernal, V., and Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins: a calorimetric study. *J. Dairy Res*, 68, 2847-2852.
- Biemel, K.M, Conrad, J., and Lederer, M.O. (2001). Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of a pentosidine precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (26), 23405-23412.
- Bigi, A., Panzavolta, S., and Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675-5680.
- Bornstein, P., and Traub, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. (Neurath H & Hill R L, Eds.) The proteins. New York: Academic Press. Vol. 4. pp 457- 461.
- Borue, V. Yu., and Erukhimovich, I. Ya. (1990). A Statistical Theory of Globular Polyelectrolyte Complexes, *Macromolecules*, 23, 3625-3632.
- Boulvert, F. (2006). Analyse de milieux fortement diffusants par polarimétrie de Mueller et méthodes optiques cohérentes. Application à l'étude du syndrome cutané d'irradiation aiguë. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale U.F.R. Sciences et Techniques de Brest.
- Bourriot, S. (1999). Comportement de phase, rhéologie et ultrastructure des mélanges caséines micellaires/polyosides. Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy.
- Bowman, W. A., Rubinstein, M., and Tan, J. S. (1997). Polyelectrolyte-Gelatin Complexation: Light Scattering Study. *Macromolecules*, 30, 3262-3270.
- Boye, J.I., Ismail, A.A., and Alli, I. (1996). Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *J. Dairy Res*, 63, 97-109.

Braudo, E. E., and Antonov, Y. A. (1993). Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. Dans K. D. Schwenke et R. Mothes (Eds), *Food Proteins, Structure and Functionality*, pp. 210-215, Weinheim: VCH.

Bull, H.B., and Bresse, K. (1978). Interaction of alcohols with proteins. *Biopolymers*, 17, 2121 -2131.

Bungenberg de Jong, H. G. (1936). Dans E. Fauré-Fremiet (Eds), *La coacervation complexe et son importance en biologie*, vol. 1, Paris : Hermann et Cie.

Burgess, D.J. (1990). Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 140, 227-238.

Burgess, D. J., Kwok, K. K., and Megremis, P. T. (1991). Characterization of albumin-acacia complex coacervation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 232-236.

Burgess, D.J. (1994). Complex coacervation : Microcapsule formation, pp. 281-300, dans: Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., and Thies, C. (Eds), *Macromolecular complexes in chemistry and Biology* Springer Verlag: Berlin.

Buron, C., Filiatre, C., Membrey, F., Foissy, A., and Argillier, J. F. (2004). Interactions between gelatin and sodium dodecyl sulphate: binding isotherm and solution properties. *Colloid and Polymer Science*, 282, 446 - 453.

Byler, D.M., and Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25, 469 - 487.

C

Capitani, C., Pérez, O.E., Pacheco, B., Teresa, M., and Pilosof, A.M.R. (2007). Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of β -lactalbumin and α -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 21, 1344-1354.

Casal, H. L., Köhler, U., and Mantch, H. H. (1988). Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, 957, 11-20.

Centeno, A.C., Marcelo I.G., Yamazakilep, A., and Dellavedova, C.O. (2004). Characterization by FTIR of the effect of lead white the physical properties of proteinaceous binding media. *Journal of American institute for conservation*, 43, 139-150.

Chang, H.M., Lu, T.C., Chen, C.C., Tu, Y.Y., and Hwang, J.Y. (2000). Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 995-999.

Charpentier, D., Mocanu, G., Carpov, A., Chapelle, S., Merle, L., and Muller, G. (1997). New hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 33, 177-186.

Chen, S. L., Krishnan, L., Srinivasan, S., Benziger, J., J., and Bocarsly, A. B. (2004). Ion exchange resin/poly styrene sulfonate composite membranes for PEM fuel cells. *Journal of Membrane Science*, 243, 327-333.

Chen, W.S., Henry, G. A., Gaud, S. M., Miller, M. S., Kaiser, J. M., Balmadeca, E. A., Morgan, R. G., Baer, C. C., Borwankar, R. P., Hellgeth, L. C., Strandholm, J. J., Hasenheuttl, G. L., Kerwin, P. J., Chen, C. C., Kratochvil, J. F., and Loyd, W. L. (1989). Microfragmented ionic polysaccharide/protein complex dispersions. *European Patent Application 0,340,035,A2*, Kraft General Foods Inc.

Chen, C. H., Wang, F. Y., Mao, C. F., Liao, W. T., and Hsieh, C. D. (2008). Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 37- 42.

Chene, C. (2002). La gélatine. *Journal de L'Adrianor, Agro-Jonction*, 24, Fontanille, M., and gnanou, Y. *Chimie et physico-chimie des polymères: 2 et 3 Cycles*, (Eds), Dunod, Paris, pp 223 - 466 - 473.

Cherif, S. (2010). Analyse des milieux diffusants par polarimétrie de Mueller, Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, 165 p.

Chevalier, C. (2005). Biochimie structurale : les protides, *Cours biochimie Protides IFTAB*.

Coffey, D. G., Bell, D. A., and Henderson, A. (1995). Cellulose and Cellulose Derivatives, in Stephen A.M., *Food Polvsaccharides and their a lications*, Marcel Dekkerinc, pp. 123-153, 501-515.

Cortesi, R., Nastruzzi, C., and Davis, S.S. (1998). Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. *Biomaterials*, 19, 1641-1649.

D

Dautzenberg, H. (2000). Polyelectrolyte complex formation: Role of a double hydrophilic polymer. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201, 1765-1773.

Dautzenberg, H., and Jaeger, W. (2002). Effect of charge density on the formation and salt stability of polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203 (14), 2095-2102.

De Kruif, C., and Tuinier R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Journal of Hydrocolloides*, 15, 555-563.

Delaunois, F. (2002). Les dépôts chimiques de nickel-bore sur les alliages d'aluminium. Thèse de Doctorat, Faculté Polytechnique de Mons.

Desbrieres, J., and Rinaudo, M. (1981). Formation of polyelectrolyte complexes in an organic-solvent. *European Polymer Journal*, 17, 1265-1269.

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interaction in food colloids. Dans: Food colloids and polymer: Stability and mechanical proper ties. Dickinson, E. & Walstra, P. (Eds), Royal Chem Soc., Cambridge, U.K., pp 77- 93.

Dickinson, E., and McClement, D.J. (1996). Molecular Basis of Protein Functionality. In *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic: London, pp 27-76.

Dickinson, E., and Pawlowski, K. (1996). Effect of high-pressure treatment of protein on the rheology of flocculated emulsions containing protein and polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2992-3000.

Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharides interactions. *Trends in food science and technology*, 9,347-354.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed Systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

Djabourov, M., Maquet, J., Theveneau, H., Leblond, J., and Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17 (2), 169-174.

Donato, L. (2004). Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Nancy.

Dong, A., Prestrelki, S. J., Allison, S. D., and carpenter, J. F. (1995). Infrared Spectroscopy Studies of Lyophilization and temperature-Induced Protein Aggregation. *Pharm.Sci*, 84, 415-424.

Douglas, N.G., Humffray, A.A., Pratt, H.R.C., and Stevens, G.W. (1995). Electrophoretic mobilities of proteins and protein mixtures. *Chem. Eng. Sci.*, 50, 749-754.

Dragan, E. S., Mihai, M., and Schwarz, S. (2006). Polyelectrolyte complex dispersions with a high colloidal stability controlled by the polyion structure and titrant addition rate. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 290, 213-221.

Dufour, E., Dalgarrondo, M., and Haertle, T. (1994). Limited proteolysis of β -Lactoglobulin using thermolysin effects of calcium on the outcome of proteolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, 37- 41.

E

Easton, I.A., and Gorham, S.D. (1986). Protein-polysaccharide complexes. *US Patent Application*, 4, 614, 794.

Ellis, D.L., and Yannas, I.V. (1996). Recent advances in tissue synthesis *in vivo* by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials*, 17, 291-299.

F

Fang, Y., Li, L., Inoue, C., Lundin, L., and Appelqvist, I. (2006). Associative and segregative phase separations of gelatin/ κ -carrageenan aqueous mixtures. *Langmuir*, 22, 9532-9537.

Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Cooke, P.H., Piergiovanni, L., and Yamb, K. L. (2011). Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 25, 61-70.

Feng, X., Leduc, M., and Pelton, R. (2008). Polyelectrolyte complex characterization with isothermal titration calorimetry and colloid titration. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 317, 535-542.

Flory, P. J. (1942). Thermodynamics of high polymer solutions. *J. Chem. Phys*, 10, 51-61.

Friess, W., and Lee, G. (1996). Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. *Biomaterials*, 17, 2289-2294.

Frugier, D., and Audebert, R. (1994). Interaction between oppositely charged low ionic density polyelectrolytes : complex formation or simple mixture? Dans Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schultz, D. N., & Thies, C. (Eds), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp135-149, Berlin : Springer Verlag.

G

Ganz, A. J. (1977). Cellulose hydrocolloids, in Horace Graham, D., (Eds), *Food Colloids*, AVI inc., Connecticut, 17, pp 3834.

Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., and Amin Mohammadifar, M. (2014). Characterisation of gum tragacanth (*Astragalus gossypinus*)/sodium caseinate complex coacervation as a function of pH in an aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 34, 161-168.

Giraudier, S. (2004). Remodelage dynamique de gels de protéines : études de transitions de gélification catalysées par des enzymes à activités antagonistes, Thèse de Doctorat de l'université du Cergy-Pontoise.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.

Grinberg, V.Ya. and Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of protein and polysaccharides in solutions. *Food hydrocoll*, 11 (2), 145-158.

Grymonpré, K.R., Staggemeier, B.A., Dubin, P.L., and Mattison, K.W. (2001). Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site. *Biomacromolecules*, 2, 422- 429.

Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., and de la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100 (1), 145-151.

H

Hamano, T., Suzuki, H., Teramoto, A., Iizuka, E., and Abe, K. (1998). Functional culture of human periodontal ligament fibroblast (HPLF) on polyelectrolyte complex (PEC). *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, A35, 439-455.

Harding, J. J. (1965). The unusual links and cross-links of collagen. *Advances in Protein Chemistry*, 20, 109-190.

Harding, S., Jumel, K., Kelly, R., Gudo, E., Horton, J. C. and Mitchell, J. R. (1993). The structure and nature of protein-polysaccharide complexes. In: Schwenke, K. D., & Mothes, R., *Food Proteins, Structure and Functionality* pp 216-226, Weinheim: VCH.

Harrington, W.F., & Rao, N.V. (1970). Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9 (19), 3714-3724.

Hattori, M., Numamoto, K-i., Kobayashi, K., & Takahashi, K. (2000). Functional changes in β -Lactoglobulin by conjugation with cationic Saccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2050-2056.

Haugstad, G., and Gladfelter, W. L. (1993). Atomic force microscopy of AgBr crystals and adsorbed gelatin films. *Langmuir*, 9, 1594-1600.

Hellio-Serughetti, D. (2004). Les gels physiques et chimiques de gelatin, Thèse de Doctorat de l'université de l'université de Paris VI.

Hill, R.D., and Zadow, J.G. (1974). The Precipitation of Whey Proteins by Carboxymethylcellulose of Differing Degrees of Substitution. *J. Dairy Sci.*, 41, 373-380.

Hongshun, Yang., Yifen, Wang., Peng, Zhouc., and Regenstein, Joe M. (2008). Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, 22, 1541-1550.

Huggins, M. L. (1942). Theory of solutions of high polymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 1712-1719.

Hunter, R. J. (1986). Transport properties of suspensions. Dans Hunter, R. J., (Eds), *Foundations of colloid science*, vol. 1, pp 494-536, New York: Oxford University Press.

I

Imeson, A. P., Ledward, D. A., and Mitchell, J. R. (1977). On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 669-672.

Israelachvili, J. (1992). Intermolecular and surface forces 2nd Edition Academic Press, London.

J

Jaison, S. (2005). Influence de la carbonylation sur les protéines structurales du collagène de type I et Interactions avec les polynucleaires neutrophiles Humains. Thèse de doctorat Université de Reims-Champagne Ardenne.

Jeyarajah, S., and Allen, J.C. (1994). Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 80-85.

Jirgensons, B. (1969). Optical Rotatory dispersion of proteins and other macromolecules. Springer-Verlag, Berlin, Helderberg, New-York.

Jones, R. C. A new calculus for the treatment of optical systems, *J.O.S.A.* (1941). 31, 488-493, (1941). 31, 493-499, (1941). 31, 500-503, (1942). 32, 486-493, (1947). 37, 107-110; (1947). 37, 110-112.

Jones, B.E. (1987). “ In hard capsules-development and technology ”; Ridgway, K., (Eds); The Pharmaceutical: London, U.K., pp 39-48.

K

Kaibara, K., Watanabe, T., and Miyakawa, K. (2000a). Characterization of Critical Processes in Liquid-Liquid Phase Separation of Elastomeric Protein-Water System: Microscopic Observations and Light Scattering Measurements. *Biopolymers*, 53, 369-379.

Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H. B., and Dubin, P. L. (2000b). pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 1, 100-107.

Kargina, O. V., Badina, E. Y., Prazdnichnaya, O. V., and Yurgens, I. D. (1999). Ternary interpolymer complex based on poly(acrylic acid), sodium polyphosphate, and piperazine. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya a & Seriya B*, 41, 1835-1838.

Karimia, F., Taheri Qazvini, N., and Namivandi-Zangeneha, R. (2013). Fish gelatin/Laponite biohybrid elastic coacervates: A complexation kinetics–structure relationship study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 102-113.

Karim, A., and Bhat R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects, *Journal of Trends in food Science & Technologie*, 19, 644-656.

Keller, J. D. (1984). Sodium Carboxymethylcellulose (CMC). *New York State Agricultural Experiment Station*, 53, 9-19.

Keller, J. D. (1986). Sodium Carboxymethylcellulose», in: Glicksman M., (Eds) *Food Hydrocolloids*, vol. III, CRC Press, Florida, pp. 45 -104.

Kim, H. J., and Lee, M.Y. (1993). Synthesis and properties of diethylaminoethyl chitosan. *Polymer*, 34, 1952-7.

Koh, G. L., and Tucker, I. G. (1988a). Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by viscosity, turbidity and coacervate wet weight and volume measurements. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 233-236.

Koh, G. L., and Tucker, I. G. (1988b). Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by chemical analysis of the coacervate and equilibrium fluid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 309-312.

Kong, C. Y., and Muthukumar, M. (1998). Monte Carlo Study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces. *J. Chem. Phys.*, 109, 1522-1527.

L

Laneuville, S.I., Paquin, P., and Turgeon, S.L. (2005). Formula optimization of a low-fat food system containing whey protein isolate-xanthan gum complexes as fat replacer. *Journal of Food Science*, 70, 513-519.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., and de Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food hydrocoll.*, 14, 273-280.

Langmaier, F., Mokrejs, P., Kolmaznik, K., and Mladek, M. (2008). Plasticizing collagen hydrolysate with glycerol and low-molecular weight poly (ethylene glycols). *Thermochemical Acta*, 469, 52-58.

Lavalle, P., Boulmedais, F., Ball, V., Mutterer, J., Schaaf, P., and Voegel, J. C. (2005). Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method. *Journal of Membrane Science*, 253, 49-56.

Ledward, D.A. (1979). Protein-Polysaccharide Interactions. In *Polysaccharides in Food*, Butterworth & Co Ltd: London, pp 205-217.

Ledward, D. A. (1994). Protein-polysaccharide interactions, Dans: Protein functionality in food systems, Hettiarachchy N.S. et Zieger, G.R (Eds), Marcel Dekker, New-York, pp. 225-259.

Lee, Y. M., Nam, S. Y., and Kim, J.H. (1999). Pervaporation of water-ethanol through poly(vinyl alcohol)/chitosan blend membrane. *Polym Bull*, 29, 423-8.

Lefèvre, T., & Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy : Model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15, 365-376.

Lemay, G. (2000). Etude de la stabilité thermique des protéines de lactosérum et de leur comportement en solution, en présence de divers dextrans, Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.), Faculté des études supérieures de l'université Laval, 76 p.

Lii, C. Y., Liaw, S. C., Liic, Y. V. M.-F., Liaw, S. C., Lai, V. M., and Tomasik, P. (2000). Xanthan gum-gelatin complexes. *European Polymer*, 38, 19-26.

Lin, W., Yan, Y., Mu, C., Li, W., Zhang, M., and Zhu, Q. (2002). Effect of pH on gelatin self-association investigated by laser light scattering and atomic force microscopy. *Polymer International*, 51, 233-238.

Liu, L., Zhao, Q., Liu, T., and Zhao, M. (2011). Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate/xanthan gum mixtures at the oil-water interface. *Food Hydrocolloids*, 25, 921-927.

M

Ma, J., Xu, Y., Fan, B., and Liang, B. (2007). Preparation and characterization of sodium carboxymethylcellulose/poly (N-isopropylacrylamide/clasemi-IPN nanocomposite hydrogels. *European Polymer Journal*, 43, 2221-2228.

Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., and Morris, V. J. (1998). Gelation of gelatin observation in the bulk and at the air-water interface. *Biopolymers*, 46, 245-252.

Maitland, D. J. (1995). Dynamic Measurements of Tissue Birefringence: Theory and Experiments, PhD dissertation, Dept Physics, Northwestern University, Evanston.

Mattison, K.W., Brittain, I.J., and Dubin, P.L. (1995). Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries. *Biotechnol. Prog.*, 11, 632-637.

Mattisson, K. W., Wang, Y., Grymonpré, K., and Dubin, P. L. (1999). Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte systems. *Macromol. Symp.*, 140, 53-76.

Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemain, S., and Hardy, J. (2005). pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum. *Langmuir*, 21, 386-394.

Merveille, C. N. D. (2011). Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes, Thèse de Doctorat de l'université du Maine faculté des Science.

Meyer, M. C., Straughn, A. B., Mhatre, R. M., Hussain, A., Shah, V. P., Bottom, C. B., Cole, E.T., Lesko, L. L., Mallinowski, H., and Williams, R. L. (2000). The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. *Pharmaceutical Research*, 17 (8), 962-966.

Michaels, A. S., and Miekka, R. G. (1961). Polycation-Polyanion Complexes - Preparation and Properties of Poly-(Vinylbenzyltrimethylammonium) Poly-(Styrenesulfonate). *Journal of Physical Chemistry*, 65, 1765-1773.

Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B., and Parker, A. (1996). Viscoelastic behavior of gelatin/iota-carrageenan mixtures. *J. Chim Phy.*, 93, 828-836.

Michon, C., Vigouroux, F., Boulenguer, P., Cuvilier, G., and Launay, B. (2000). Gelatin/iotacarrageenan interaction in non-gelling conditions. *Food*, 14, 203-208.

Milanovi, J., Petrovi, L., Sovilj, V., and Katona, J. (2014). Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 37 196-202.

Milch, R. A. (1964). Infra-red spectra of deuterated gelatin sols. *Nature*, 202, 84-85.

Mohanty, B., and Bohidar, H. B. (2005). Microscopic structure of gelatin coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36, 39-46.

Moller, C., & Allen, M. (1999). Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *J. of Biophys*, 2, 1150-8.

Montilla, A., Casal, E., Javier Moreno, F., Belloque, J., Olano, A., & Corzo, N. (2007). Isolation of bovine β -lactoglobulin from complexes with chitosan. *International Dairy Journal*, 17, 459-464.

Morris, V. J., Kirby, A. R., and Gunning, A. P. (1999). Using atomic force microscopy to probe food biopolymer functionality. *Scanning*, 21(5), 287-292.

Morr, C.V., and Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 33, 431-476.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., and Duodu, K. G. (2004). Spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86, 325-332.

N

Nakajima, A., and Sato, H. (1972). Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. *Biopolymers*, 10, 1345-1355.

Netz, R. R., and Joanny, J-F. (1998). Complexation Behavior of Polyampholytes and Charged Objects, *Macromolecules*. 31, 5123-5141.

Netz, R. R., and Joanny, J-F. (1999). Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces: Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation. *Macromolecules*, 32, 69013-9025.

Norton, I.T., and Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15, 543-553.

Nyström, B., Kjoniksen, A.-L., and Iversen, C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Adv. in colloids and Interface Sci.*, 79, 81-103.

O

Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., and Favaro-Trindade, C.S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 685-693.

Onesippe, H. (2005). Etude des systèmes polyelectrolyte/tensioactif en phase aqueuse et à l'interface liquide/Gaz : application à l'élaboration de micro-capsules, Thèse de Doctorat de L'université Montpellier II.

Ou, Z. Y., and Muthukumar, M. (2006). Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation : Langevin dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 124 (11), 114502.

Overbeek, J.T.J.; and Voorn, M.J. (1957). Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49 (S1)7.

P

Pal, K., Ajit, K., and Dipak, K. (2007). Preparation and characterization of polyvinyl Alcohol-gelatin Hydrogel Membranes for Biomedical Applications. *Pharmsci Tech*, 8, 21-75.

Palmieri, G.F., Lauri, D., Martelli, S., and Wehrle, P. (1999). Methoxybutyrate microencapsulation by gelatin-acacia complex coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 399-407.

Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L., and Xia, J. (1992). Effect of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25, 290-295.

Penă, C., and Koro, C. (2010). Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Biosource Technology*, 101, 6836-6842.

Pépin, A. S. (2010). Nouveaux complexes polyelectrolytes à amphiphilie contrôlée à base de polysaccharides modifiés, Thèse de doctorat, Université de Rouen, France.

Perez, S., and Mazeau, K. (2005). Conform actions, structures, and morphologies of celluloses in Polysaccharides, (Eds) Severian, D., Marcel Dekker, Inc, New York. pp. 41-68.

Petzold, G., Nebel, A., Buchhammer, H. M., and Lunkwitz, K. (1998). Preparation and characterization of different polyelectrolyte complexes and their application as flocculants. *Colloid and Polymer Science*, 276, 125-130.

Pezron, I., Djabourov, M., and Leblond, J. (1991). *Polymer*, 32 (17) 3201.

Philippe, B., Dautzenberg, H., Linow, K. J., Kotz, J., and Dawydoff, W. (1989). Poly-Electrolyte Complexes-Recent Developments and Open Problems. *Progress in Polymer Science*, 14, 91-172.

Pogodina, N. V., and Tsvetkov, N. V. (1997). Structure and Dynamics of the Polyelectrolyte Complex Formation. *Macromolecules*, 30, 4897-4904.

Poincaré, H. (1892). *Théorie mathématique de la lumière*, Gauthiers-Villars, vol. 2, Paris.

Pollard, T.D., and Earnshaw, W.C. (2004). *Biologie cellulaire*. Paris: Elsevier Science Inc.

Portsch, A. (2011). The phase behaviour, flow behaviour, and interfacial properties of protein-polysaccharide aqueous two-phase systems with sugar, A thesis submitted to The University of Birmingham for the degree of Doctor of philosophy (PhD).

R

Rbii, K. (2010). Formation d'agrégats de hauts poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse, Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.

Renard, C.M.G.C., and Thibault, J.F. (1993). Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydr. Res.*, 244, 99-114.

Ren, J.L., Sun, R.C., and Peng, F. (2008). Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, 93, 786-793.

Rivero, S., García, M. A., and Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531-539.

S

Sagalowicz, L., and Leser, M.E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, 15, 61-72.

Saint- aubin, K. (2010). Etude de dispersions de nanotubes de carbone par des polymères pour l'élaboration de composites conducteurs et structurés, Thèse de doctorat de l'université Bordeaux I, 188 p.

Samaké, D. (2008). Traitement des eaux usées de tannerie à l'aide de matériaux à base d'argile, Thèse de doctorat l'université Bamako, Grenoble.

Sanchez, C., and Paquin, P. (1997). Protein and protein-polysaccharide microparticles. Dans S. Damodaran et A. Paraf (Eds), *Food Proteins and Their Applications*, pp 503-528, New York: Marcel Dekker, Inc.

Saxena, A., Sachin, K., Bohidar, H. B., and Verma, A. K. (2005). Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 42-48.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., and Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes. *A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 8, 689-753.

Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., and Hardy, J. (1999). Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13, 483-496.

Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F. and Hardy, J. (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14, 4, 403-413.

Schmitt, C. (2000). Etude de la coacervation complexe entre la β - lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Schrieber, R., and Gareis, H. (2007). *Gelatin Handbook: Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH.

Sedláková, E., and Antalík, M. (1998). Coulombic and Noncoulombic effect of Polyanions on Cytochrome Structure. *Biopolymers*, 46, 145-154.

Segtnan, V.H., Kvaal, K., Rukke, E.O., Schuller, R.B., and Isaksson, T. (2003). Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17, 585-592.

Semenova, M.G., Bolotina, V.S., and Dmitochenko, A.P. (1991). The factors affecting the compatibility of serum albumin and pectinate in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.*, 15, 367-385.

Semenova, M., and Dickinson, E. (2010) *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions*. Brill, Leiden, Boston.

Singh, O. N., and Burgess, G. J. (1989). Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41, 670-673.

Soury-Lavergne Navizet, I. (2004). *Modélisation et analyse des propriétés mécaniques des protéines*, Thèse de Doctorat de l'université Paris.

Stern, R. (2005). Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie*, 53, 372-382.

Stokes, G. G. (1852). On the composition and resolution of streams of polarized light from different sources. *Trans Cambridge Phil. Soc.*, 9, 339-416.

Surewicz, W.K., and Mantsch, H.H. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 952, 115-130.

Su, J. F., Huang, Z., Yuan, X. Y., Wang, X. Y., and Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79, 145-153.

Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F., Bauer, W., and Klostermeyer, H. (1995). *Whey Protein + Polysaccharide Mixtures: Polymer incompatibility and its application.*, Dans: *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson, E. and Lorient, D. (Eds), Special publication, No. 156, Royal Society of Chemistry, London, pp 328-339.

Syrbe, A. (1997). *Polymer incompatibility in aqueous why protein and polysaccharide solutions*. Thèse de doctorat l'université Technique de Munich, Allemagne.

Szorcsik, A., Nagy, L., Scopelliti, M., Pellerito, L., and Sipos, P. (2006). Characterization of complexes formed between $[\text{Me}_2\text{Sn(IV)}]^{2+}$ and carboxymethylcelluloses. *Carbohydrate Research*, 341, 2083-2089.

T

Tainaka, K. I. (1979). Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. *J. Phys. Soc. Jpn*, 46, 1899-1906.

Tanford, C., Bunville, L.G., and Nozaki, Y. (1959). The reversible transformation of β -Lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of American Chemical Society*, 81, 4032- 4036.

Taravel, M. N., and Domard, A. (1994). Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interaction with chitosan. *I. Biomaterials*, 14, 930-938.

Tiebackx, F. W. (1911). Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide. *Z. Chem. Ind. Kolloide*, 8, 198-201.

Tirkkonen, S., Turakka, L., and Paronen, P. (1994). Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in presence of surfactants. *J. Microencapsulation*, 11, 615-626.

Tolstoguzov, V. B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. Dans J. R. Mitchell and D. A. Ledward (Eds), *Functional properties of macromolecules*, pp. 385-415, Londres : Elsevier Applied Science.

Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.

Tolstoguzov, V. B. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. Dans K. D. Schwenke et R. Mothes (Eds), *Food Proteins, Structure and Functionality*, pp. 203-209, Weinheim: VCH.

Tolstoguzov, V. B. (1995). Some physico-chemical aspect of proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food hydrocolloid*, 4(6), 429-468.

Tolstoguzov, V. B. (1996). Structure-Property Relationships in Foods ACS Symposium Series 650, Washington DC, 2.

Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. Dans S. Damodaran et A. Paraf (Eds), *Food Proteins and Their Applications*, pp. 171-198, New York: Marcel Dekker, Inc.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.

Tribet, C., Porcar, I., Bonnefont, P. A., and Audebert, R. (1998). Association between Hydrophobically Modified Polyanions and Negatively Charged Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B*, 102, 1327-1333.

Tsung, M., & Burgess, D.J. (1997). Preparation and stabilization of heparin/gelatin complex coacervate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 603-607.

Turgeon, S.L., Schmitt, C., and Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 166-178.

U

Uricanu, V. I., Duits, M. H. G., Nelissen, R. M. F., Bennink, M. L., and Mellema, J. (2003). Local structure and elasticity of soft gelatin gels studied with atomic force microscopy. *Langmuir*, 19, 8182–8194.

V

Veis, A., and Aranyi, C. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *J. Phys. Chem.*, 64, 1203-1210.

Veis, A. (1964). *The macromolecular chemistry of gelatin*. Academic Press: London.

Veis, A., Bodor, E., and Mussell, S. (1967). Molecular Weight Fractionation and the Self-Suppression of Complex Coacervation. *Biopolymers*, 5, 37-59.

Velema, J., and Kaplan, D. (2006). Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 102, 187-238.

Velzenberger, E. (2008). Validations biologiques et physico-chimiques d'un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaires bioactives, Thèse de doctorat université de technologie Compiègne.

Versic, R.J. (1988). Flavor encapsulation-An overview. In *Flavor Encapsulation*, (Eds). S.J. Risch & G.A. Reineccius, pp. 1- 6. Washington, DC: American Chemical Society. *ACS Symposium Series*, nr. 370. Watano, S. 2001. Direct control of wet granulation by image processing system. *Powder Technol.* 117, 163-172.

Von Hippel, P.H., and Wong, K.Y. (1963). The Collagen [UNK] Gelatin Phase Transition. II. Shape of the Melting Curves and Effect of Chain Length. *Biochemistry*, 2 (6), 1399-1413.

W

Walkinshaw, M.D., and Arnott, S. (1981). Conformation and interactions of pectins. II: models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.*, 153, 1075-1085.

Wang, Y., Kimura, K., Huang, Q., Dubin, P. L., and Jeager, W. (1999). Effect of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. *Macromolecules*, 32, 7128-7134.

Ward, A.G., and Courts, A. (1977). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press.

Wen, Y-p., and Dubin, P. L. (1997). Potentiometric Studies of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Poly (dimethyldiallylammonium chloride). *Macromolecules*, 30, 7856-7861.

Wilson, R. H. (1995). Recent Developments in Infrared Spectroscopy and Microscopy. In E. Dickinson (Eds), *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, pp. 177-195, Londres : Blackie Academic and Professional.

X

Xia, J., and Dubin, P. L. (1994). Protein-polyelectrolyte complexes. Dans P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz et C. Thies (Eds), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp. 247-271, Berlin : Springer Verlag.

Xing, F., Cheng, G., Yan, B., and Ma, L. (2004). Microencapsulation of Capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. *J. of Applied Polym. Sci*, 91, 2669-2675.

Y

Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., Farhat, I., and Mitchell, J. (2005). Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*, 46, 12577-12585.

Yang, H., Wang, Y., Lai, S., An, H., Li, Y., and Chen, F. (2007). Application of atomic force microscopy as a nanotechnology tool in food science. *Journal of Food Science*, 72, R65-R75.

Yang, H., Wang, Y., Regenstein, J. M., and Rouse, D. B. (2007). Nanostructural characterization of catfish skin gelatin using atomicforce microscopy. *Journal of Food Science*, 72, C430-C440.

Yang, Y., Anvari, M., Pan, C., and Chung, D. (2012). Characterization of interactions between fish gelatin and gum arabic aqueous solution. *Food Chemistry*, 135, 555-561.

Yan, P., Jin, C., Wang, C. J., Ye, P., & Xiao, J. X. (2005). Effect of surfactant head group size on polyelectrolyte-surfactant interactions: steady-state and time-resolved fluorescence study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 282, 188-192.

Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., and Kohane, D.S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.53, 7518-7525.

Z

Zaleska, H., Ring, S. G. and Tomasik, P. (2000). Apple pectin complexes with whey protein isolate, *Food hydrocolloids*, 14, 377-382.

Zimet, P., and Livney, Y.D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for [omega]-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.

Zugenmaier, P. (2001). Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in Polymer Science*, 26, 1337.

Zuñiga de Lopez, R. (1999). Etude structurale et texturale de laits acidifiés par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone et contenant des polysaccharides. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 179 p.

Zunying, L., Xiaojun, G., Yuan L., Shiyuan, D., Yuanhui, Z. and Mingyong, Z. (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. *Food Hydrocolloids*, 26, 311–317.

Sources internet

http://biochim-agro.univ-lille1.fr/brunissement/co/ch1_Introduction.html.

Annexe 1
Observations visuelles

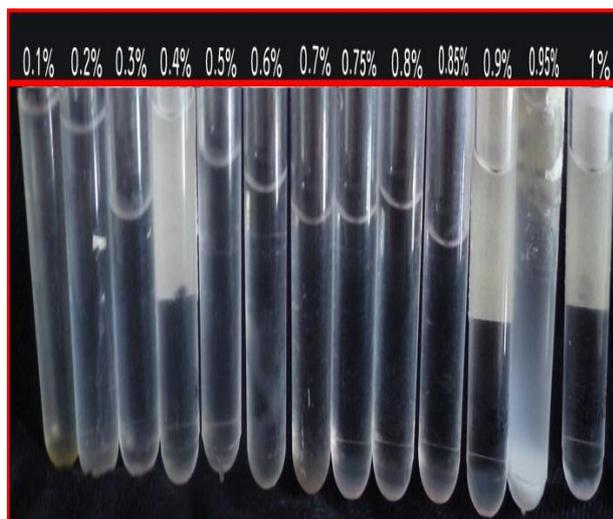


Figure A1.1: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ en fonction de la concentration à pH 4, 2.

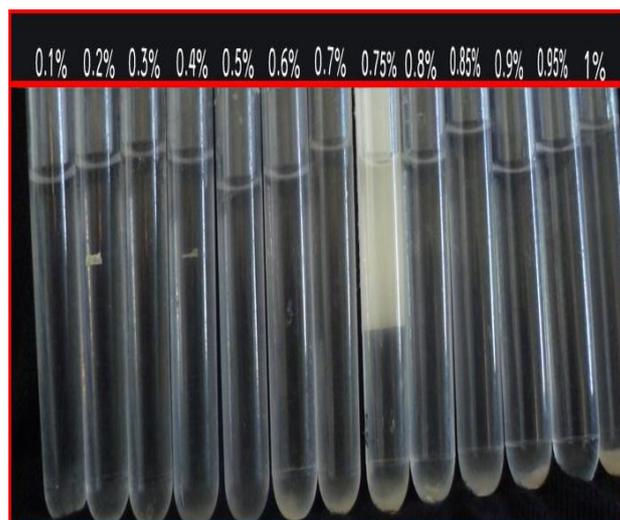


Figure A1.2: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence de NaCl (2M) .

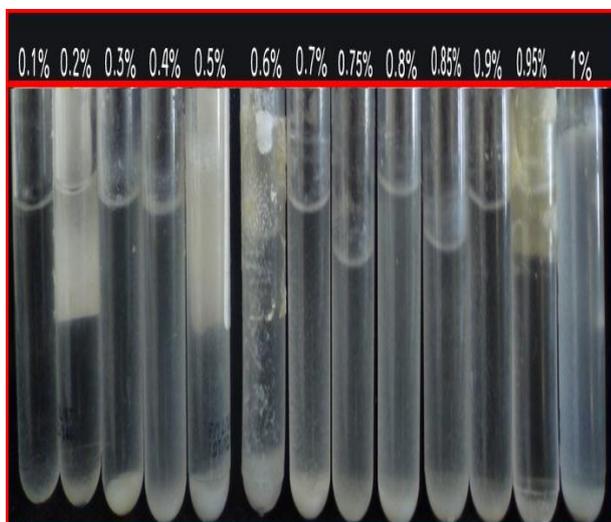


Figure A1.3: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence de (0,3M) de CaCl_2 .

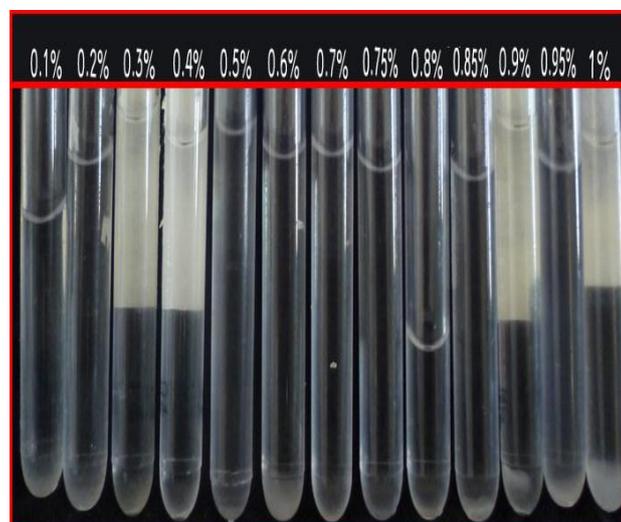


Figure A1.4: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence de (2M) du glucose.

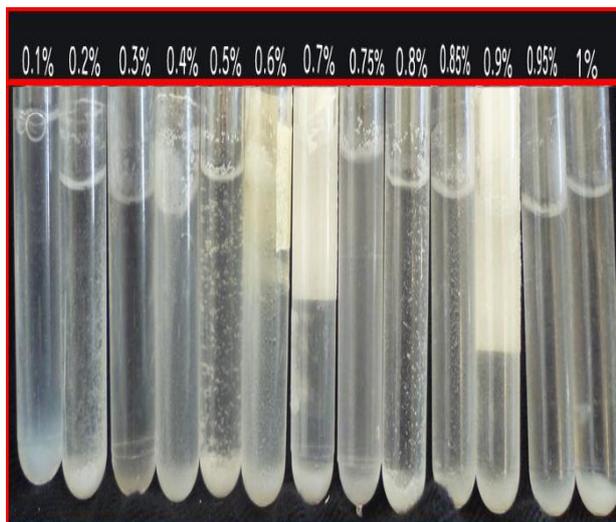


Figure A1.5: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ en fonction de la concentration à pH 5,2.

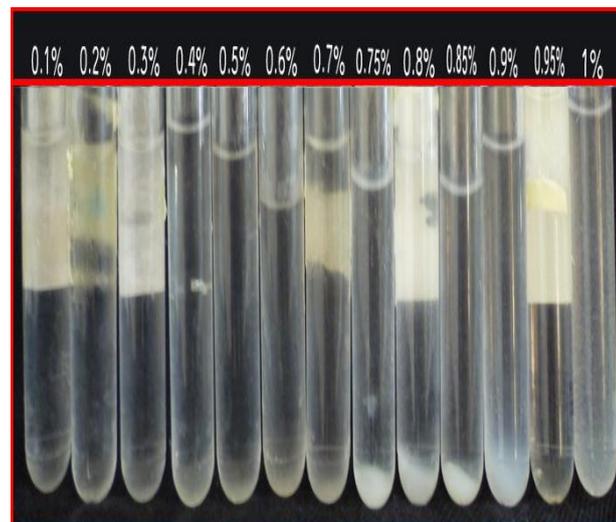


Figure A1.6: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 5,2 en présence de (2M) de NaCl.

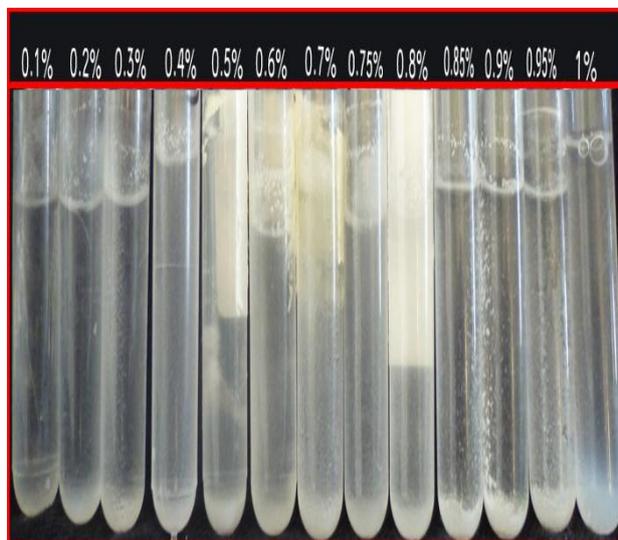


Figure A1.7: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 5,2 en présence de (0,3M) de CaCl_2 .

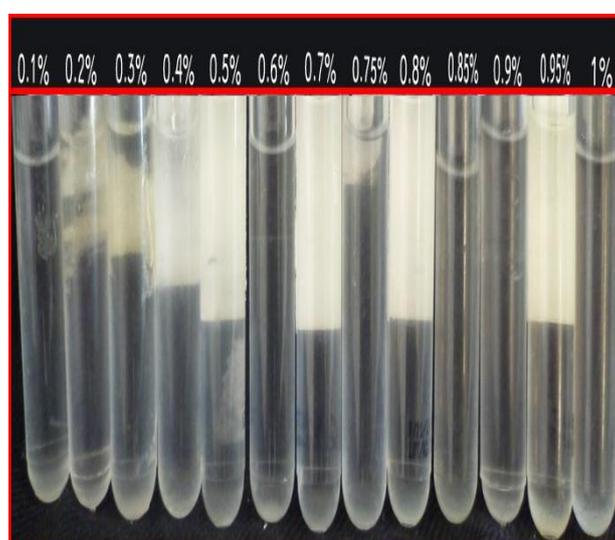


Figure A1.8: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 5,2 en présence de (2M) du glucose.

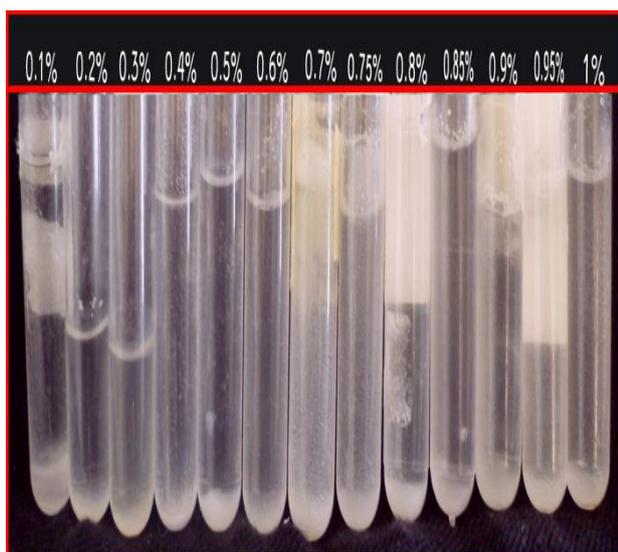


Figure A1.9: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ en fonction de la concentration à pH 7,0.

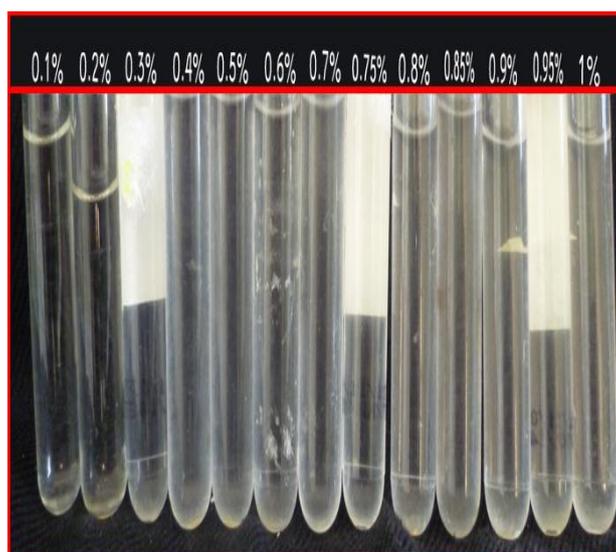


Figure A1.10: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 7,0 en présence de (2M) de NaCl.

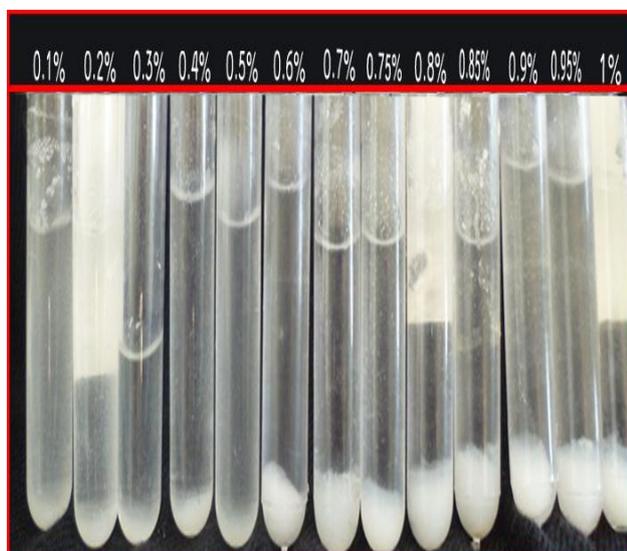


Figure A1.11: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 7,0 en présence de (0,3M) de CaCl_2 .

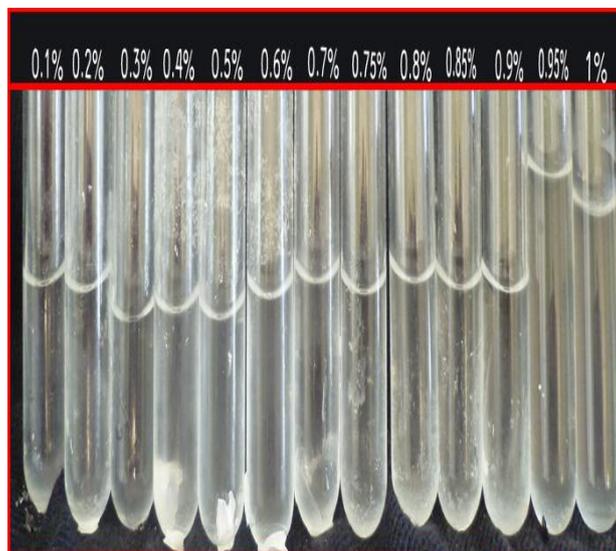


Figure A1.12: Observations visuelles pour le système $G_{\text{native}}/\text{NaCMC}$ à pH 7,0 en présence de (2M) du glucose.

Annexe 2
Diffractogrammes
rayons X

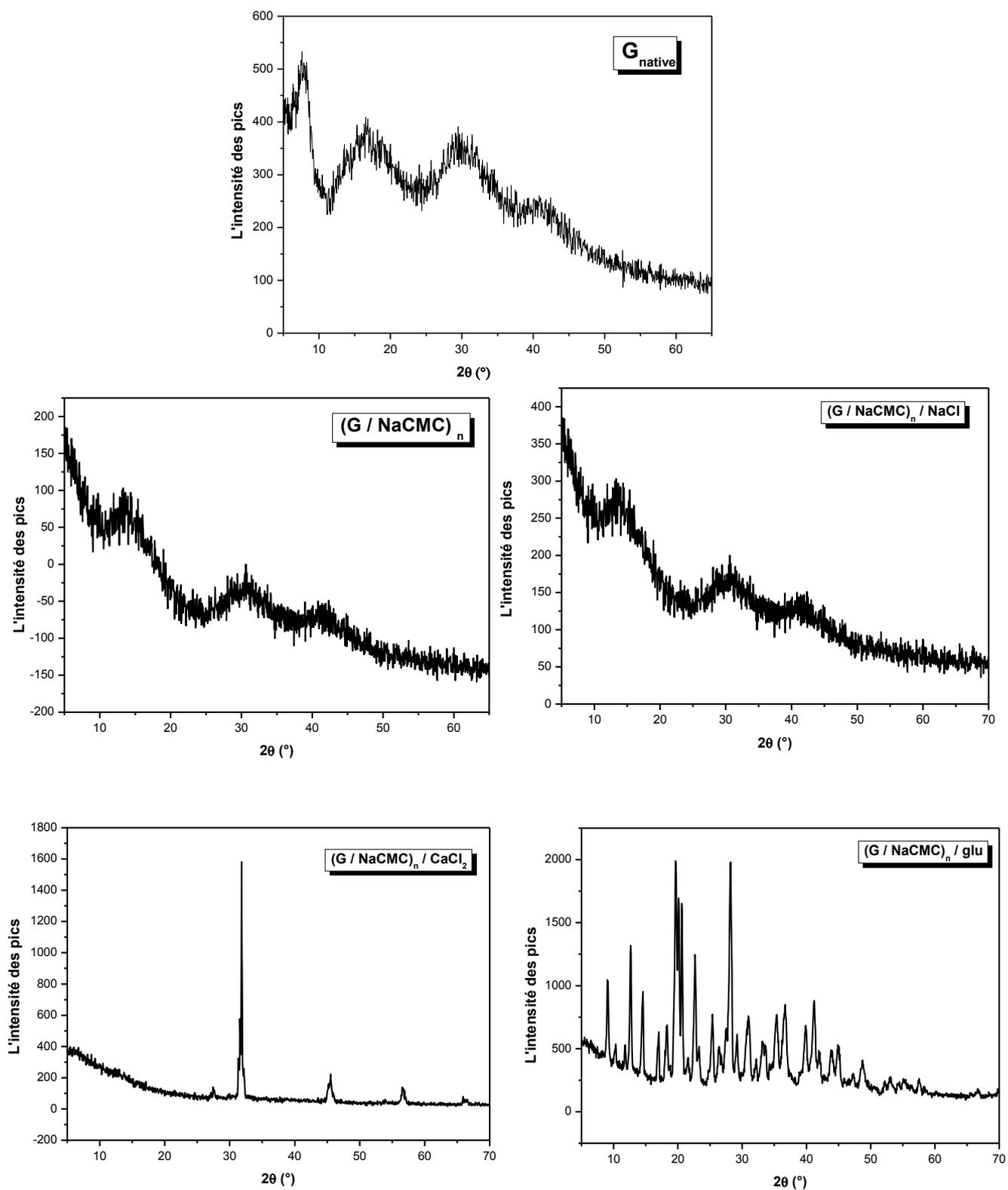


Figure A2.1. Diffractogrammes des rayons X de la gélatine native et du mélange natif en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

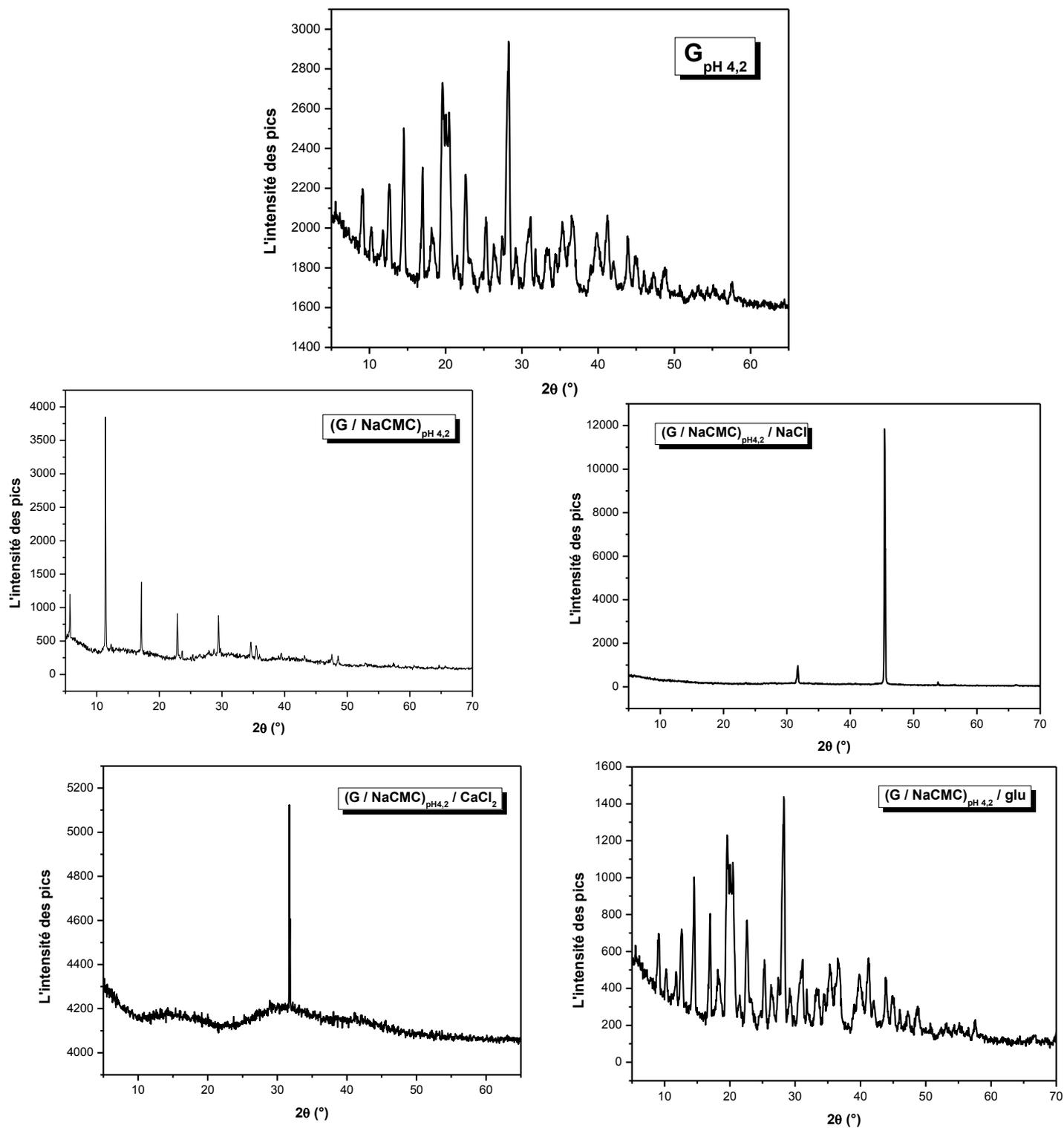


Figure A2.2. Diffractogrammes des rayons X de la gélatine à pH 4,2 et du mélange à pH 4,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

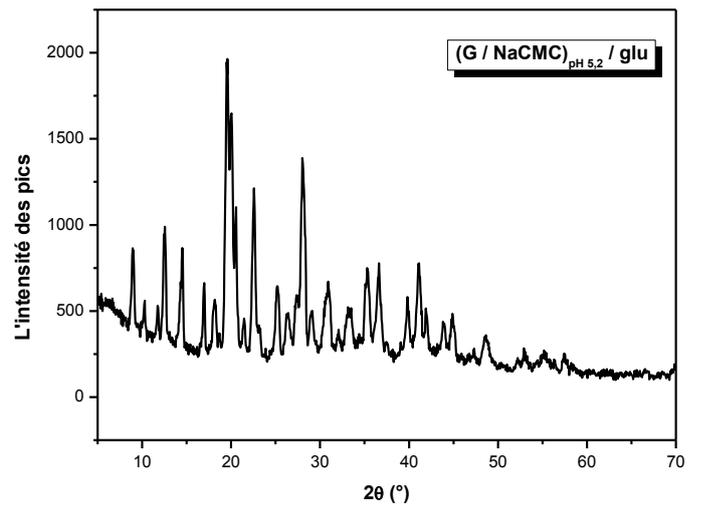
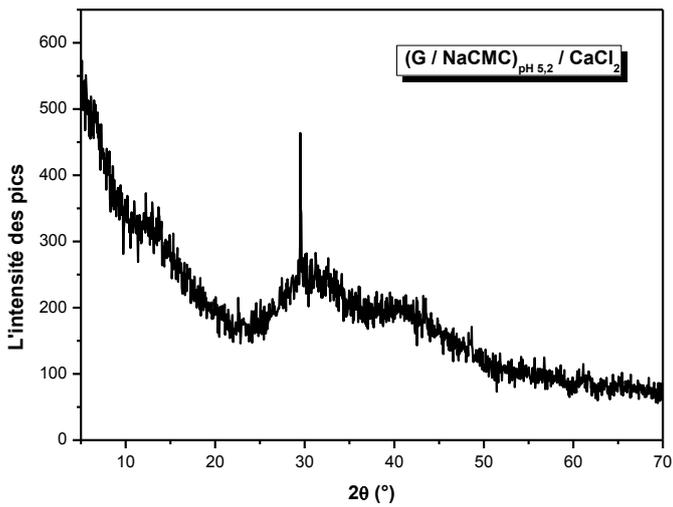
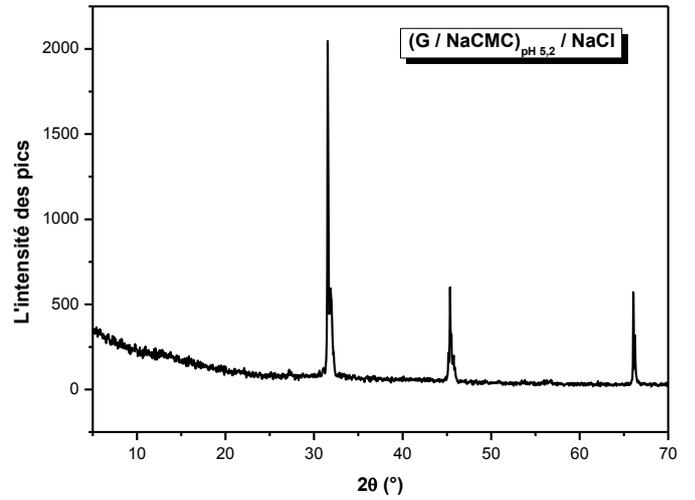
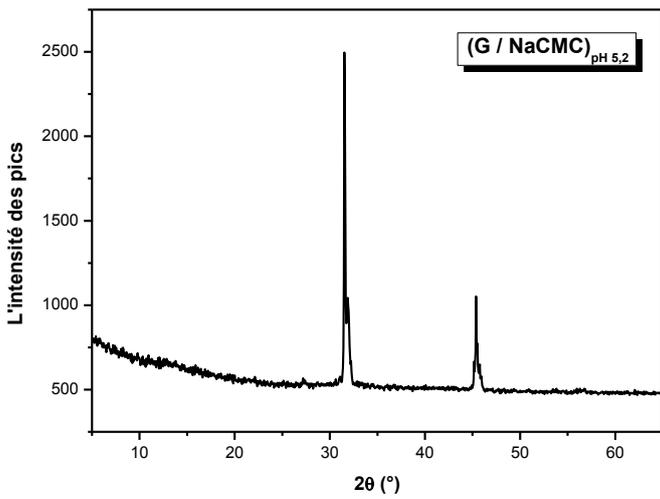
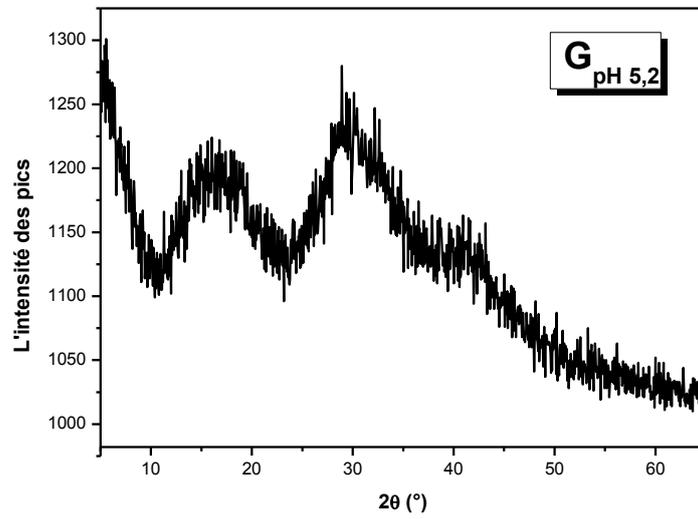


Figure A2.3. Diffractogrammes des rayons X de la gélatine à pH 5,2 et du mélange à pH 5,2 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

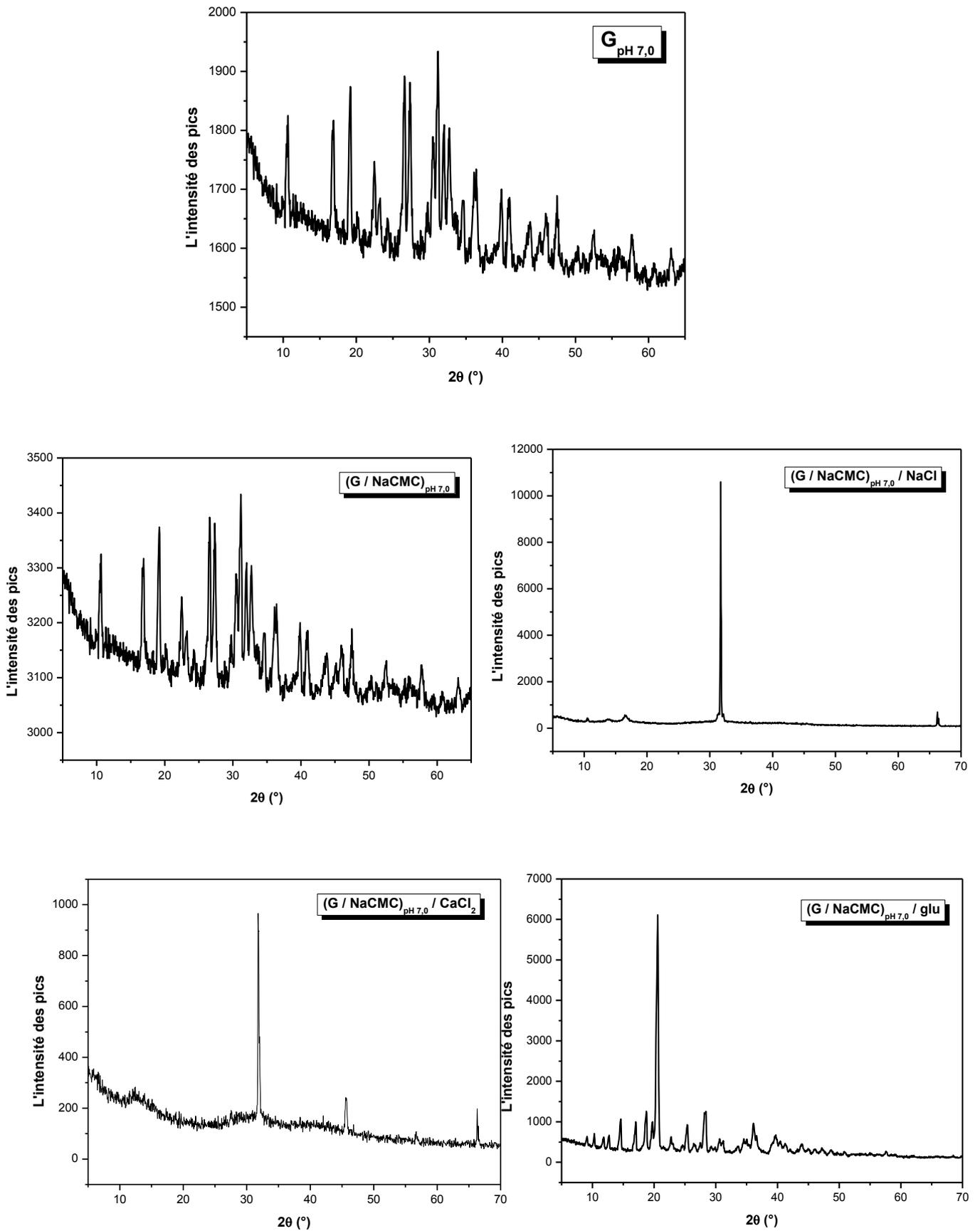


Figure A2.4. Diffractogrammes des rayons X de la gélatine à pH 7,0 et du mélange à pH 7,0 en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et glucose.

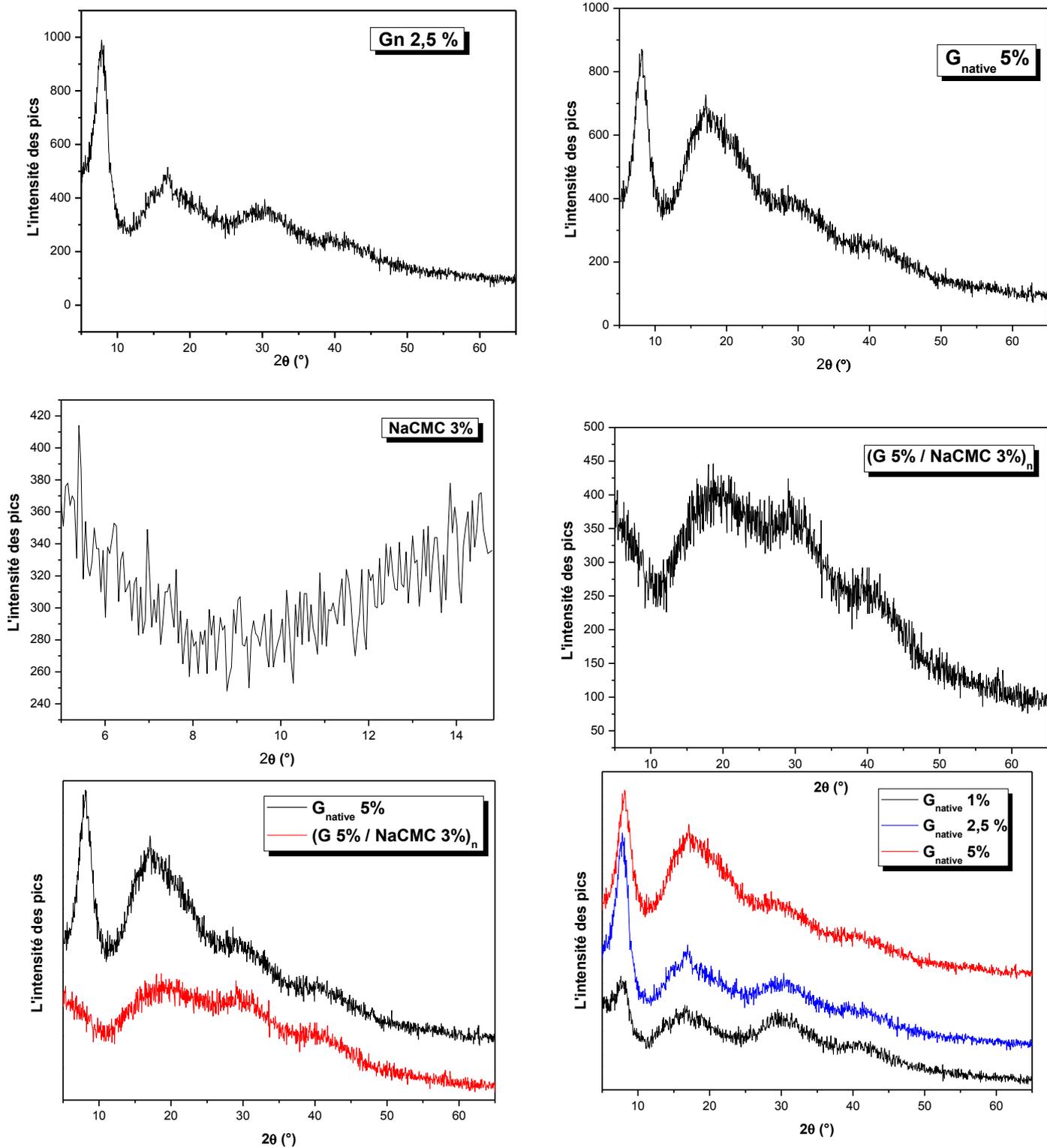


Figure A2.5. Diffractogrammes des rayons X de la gélatine native 5%, 2,5%, de la NaCMC 3% et du mélange natif (G 5% / NaCMC 3%).

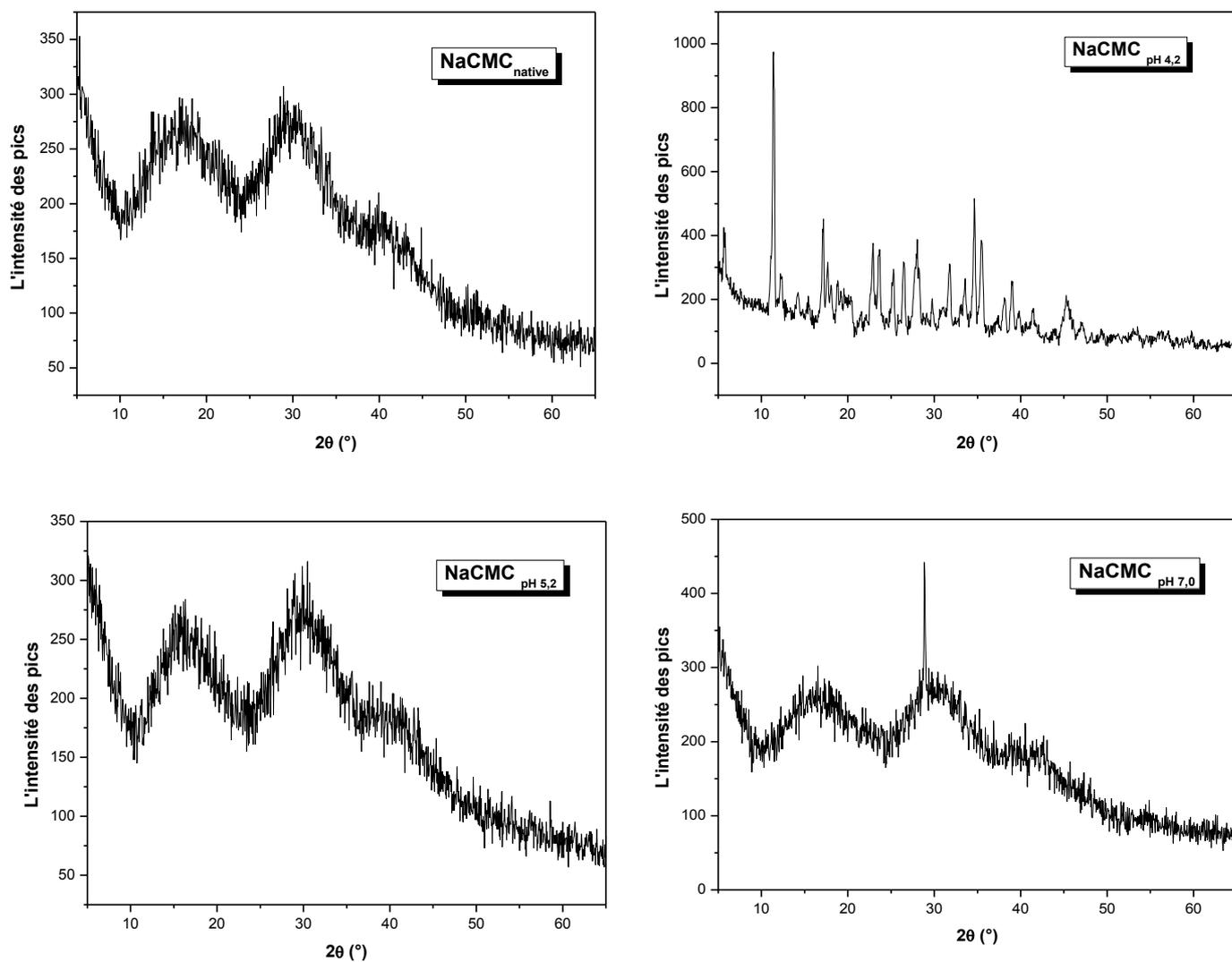


Figure A2.6. Diffractogrammes des rayons X de NaCMC native et de la NaCMC à différents pH.

Annexe 3
Polarimétrie

Tableau A3.1. Les valeurs des paramètres optiques de la gélatine seule à pH 4,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,5133	0,1633	0,1389	0,1116	0,3436	0,1392	0,0987	0,2131	0,1127	0,1203	0,0700	0,0669	0,1930
D	0,2224	0,0903	0,0747	0,0503	0,1546	0,0660	0,0533	0,0970	0,0597	0,0557	0,0378	0,0453	0,1003
R	167,5420	155,1741	118,8766	57,9525	164,5578	46,5403	69,1962	142,4907	55,1527	19,0943	40,1709	39,3320	146,7323

Tableau A3.2. Les valeurs des paramètres optiques de la NaCMC seule à pH 4,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,1587	0,1028	0,0914	0,0882	0,1349	0,1013	0,0861	0,0714	0,0606	0,1179	0,1294	0,1178	0,1724
D	0,0742	0,0539	0,0594	0,0405	0,0851	0,0517	0,0385	0,0486	0,0330	0,0486	0,0598	0,0397	0,0826
R	15,9727	31,7238	95,4956	40,6658	16,9361	57,6067	47,1352	52,1520	70,9690	19,7473	157,0748	32,9577	146,5805

Tableau A3.3. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 4,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,6623	0,1104	0,0676	0,1007	0,6889	0,0474	0,1236	0,6750	0,1220	0,1130	0,0715	0,0622	0,7071
D	0,0780	0,0277	0,0255	0,0380	0,0552	0,0045	0,0384	0,0420	0,0104	0,0350	0,0501	0,0762	0,0872
R	67,4647	44,4051	127,1386	11,6643	12,2344	15,6411	47,6810	37,3504	31,1799	120,4771	43,9246	90,0007	90,4463

Tableau A3.4. Les valeurs des paramètres optiques de la gélatine seule à pH 5,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,1429	0,1425	0,1019	0,1428	0,1335	0,1087	0,0948	0,1243	0,1657	0,1077	0,1276	0,1186	0,1179
D	0,0765	0,0663	0,0646	0,0700	0,0683	0,0563	0,0513	0,0617	0,0806	0,0576	0,0637	0,0635	0,0640
R	4,7518	151,4679	30,6174	13,4903	85,0703	71,2028	53,4019	51,0357	155,9074	34,6029	118,2623	63,5911	34,7709

Tableau A3.5. Les valeurs des paramètres optiques de la NaCMC seule à pH 5,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,1191	0,0299	0,0546	0,0807	0,1776	0,0849	0,1201	0,0568	0,1079	0,0522	0,1161	0,0685	0,1187
D	0,0533	0,0415	0,0257	0,0289	0,0900	0,0395	0,0549	0,0492	0,0456	0,0429	0,0582	0,0344	0,0680
R	20,7988	61,4623	21,3563	49,6943	47,9363	71,0966	10,9940	40,4166	14,4013	84,6553	154,5853	51,7192	48,8607

Tableau A3.6. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 5,2 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,6605	0,6773	0,6773	0,6500	0,6283	0,5927	0,5518	0,6516	0,6227	0,6291	0,6523	0,5654	0,6267
D	0,0593	0,0788	0,0788	0,0396	0,0748	0,0270	0,0330	0,0736	0,0390	0,0405	0,0280	0,0227	0,0852
R	98,8746	11,4493	11,4493	38,5417	91,3439	42,2020	66,9928	91,0024	80,6624	41,1602	55,4712	14,5841	90,8333

Tableau A3.7. Les valeurs des paramètres optiques de la gélatine seule à pH 7,0 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,0779	0,0414	0,0498	0,0506	0,0938	0,0865	0,0268	0,0678	0,0119	0,0378	0,0628	0,1067	0,1167
D	0,0302	0,0224	0,0552	0,0518	0,0270	0,0191	0,0304	0,0443	0,0244	0,0178	0,0800	0,0765	0,1066
R	173,9741	121,6036	165,8422	100,5725	125,6942	145,7322	171,2848	177,7919	167,0701	81,2007	70,7378	58,9731	109,1572

Tableau A3.8. Les valeurs des paramètres optiques de la NaCMC seule à pH 7,0 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,0522	0,0670	0,0644	0,0918	0,1095	0,1044	0,0671	0,0272	0,0165	0,0902	0,0918	0,0406	0,0639
D	0,0364	0,0484	0,0395	0,0430	0,0529	0,0555	0,0621	0,0264	0,0348	0,0575	0,0405	0,0310	0,0468
R	178,8070	134,2831	65,8779	36,8251	59,2167	114,1975	35,5384	43,2020	39,1275	132,5688	28,9392	89,1608	103,0932

Tableau A3.9. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 7,0 en fonction de la concentration.

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,1509	0,1111	0,0590	0,1097	0,1450	0,0120	0,0652	0,2258	0,0382	0,0542	0,1675	0,1340	0,2988
D	0,0681	0,0778	0,0665	0,0666	0,0714	0,0781	0,0582	0,0676	0,0633	0,0740	0,0724	0,0535	0,0636
R	102,2284	90,0774	106,4912	91,6387	99,2192	118,5566	95,1582	96,5030	100,9261	95,2857	90,0018	90,3340	102,5649

Tableau A3.10. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence de NaCl (2M).

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,0576	0,0766	0,1478	0,0810	0,0423	0,0588	0,0250	0,0417	0,0555	0,0521	0,0305	0,0557	0,2035
D	0,0470	0,0568	0,0872	0,0430	0,0099	0,0787	0,0221	0,0257	0,0311	0,0862	0,0419	0,0168	0,0567
R	85,8094	41,6518	131,9260	105,2964	75,7275	28,6235	89,7329	87,3616	80,2005	49,0272	103,9158	31,4870	82,8921

Tableau A3.11. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence de CaCl_2 (0,3M).

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,0631	0,1010	0,0665	0,0857	0,1662	0,1491	0,1563	0,0458	0,0863	0,1107	0,1439	0,0973	0,1123
D	0,0520	0,0319	0,0291	0,0173	0,0872	0,0466	0,0210	0,0176	0,0292	0,0269	0,0739	0,0267	0,0393
R	37,5348	121,4169	66,9602	53,8390	70,0218	44,3066	42,4588	61,1188	111,8880	41,8450	56,6757	64,3738	25,6993

Tableau A3.12. Les valeurs des paramètres optiques du système $G_{\text{native}}/ \text{NaCMC}$ à pH 4,2 en présence du glucose de (2M).

	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
P	0,0495	0,0325	0,0700	0,0473	0,1427	0,0381	0,0329	0,0371	0,1287	0,0808	0,0371	0,1370	0,2263
D	0,0693	0,0145	0,0337	0,0474	0,0452	0,0924	0,0460	0,0292	0,0825	0,0413	0,0442	0,0327	0,1479
R	166,3615	158,1102	173,2888	153,9859	111,5813	170,0071	130,2014	48,4763	156,8607	138,8041	164,6617	105,8733	101,6877

Tableaux A3.13. Les valeurs de l'angle de rotation de la gélatine native et dénaturée, du mélange natif et dénaturé à différents pH en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	Mélange natif		Mélange dénaturé	
	α_d (°)	α_g (°)	α_d (°)	α_g (°)
G	272,5	273,0	272,5	273,0
G/NaCMC	273,0	272,5	272,0	273,5
G/NaCMC/NaCl	272,5	273,0	272,5	272,5
G/NaCMC/CaCl ₂	272,5	272,0	272,0	272,5
G/NaCMC/glu	272,5	273,0	273,5	273,0

Composition	Mélange natif à pH 4,2		Mélange dénaturé à pH 4,2	
	α_d (°)	α_g (°)	α_d (°)	α_g (°)
G	273,5	272,5	272,5	273,0
G/NaCMC	272,5	272,0	272,5	273,0
G/NaCMC/NaCl	272,5	273,5	272,5	273,0
G/NaCMC/CaCl ₂	272,5	272,5	272,5	272,0
G/NaCMC/glu	272,5	273,0	272,5	272,5

Composition	Mélange natif à pH 5,2		Mélange dénaturé à pH 5,2	
	α_d (°)	α_g (°)	α_d (°)	α_g (°)
G	273,0	273,5	273,0	273,0
G/NaCMC	273,0	273,0	272,5	273,0
G/NaCMC/NaCl	273,0	272,5	272,5	273,0
G/NaCMC/CaCl ₂	272,5	272,5	273,0	272,5
G/NaCMC/glu	273,0	272,0	273,5	273,0

Composition	Mélange natif à pH 7,0		Mélange dénaturé à pH 7,0	
	α_d (°)	α_g (°)	α_d (°)	α_g (°)
G	273,0	272,5	272,5	272,5
G/NaCMC	273,0	273,0	273,0	273,0
G/NaCMC/NaCl	272,0	273,0	273,0	273,0
G/NaCMC/CaCl ₂	272,5	273,0	273,0	273,0
G/NaCMC/glu	273,0	273,0	273,0	273,0

Tableau A3.14. Les valeurs des angles droits et gauches de la NaCMC native et à différents pH, ainsi que du NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	α_d (°)	α_g (°)
NaCMC native	272,5	273,0
NaCMC pH 4,2	272,5	272,0
NaCMC pH 5,2	272,5	272,5
NaCMC pH 7,0	272,0	272,5
NaCl	272,0	273,0
CaCl ₂	272,5	272,0
glucose	274,0	273,5

➤ Calcul de l'angle de rotation :

$$\alpha = \frac{\alpha_g - \alpha_d}{2}$$

Tableaux A3.15. Les valeurs de l'angle de rotation de la gélatine native et dénaturée, du mélange natif et dénaturé à différents pH en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose.

Composition	Mélange natif	Mélange dénaturé
	α (°)	α (°)
G	-0,25	-0,25
G/NaCMC	0,25	-0,50
G/NaCMC/NaCl	-0,25	0,00
G/NaCMC/CaCl ₂	0,25	-0,25
G/NaCMC/glu	-0,25	-0,25

Composition	Mélange natif à pH 4,2	Mélange dénaturé à pH 4,2
	α (°)	α (°)
G	0,25	-0,25
G/NaCMC	0,25	-0,25
G/NaCMC/NaCl	-0,25	-0,25
G/NaCMC/CaCl ₂	0,00	0,25
G/NaCMC/glu	-0,25	0,00

Composition	Mélange natif à pH 5,2	Mélange dénaturé à pH 5,2
	α (°)	α (°)
G	-0,25	0,00
G/NaCMC	-0,25	-0,25
G/NaCMC/NaCl	0,25	-0,25
G/NaCMC/CaCl ₂	0,00	0,25
G/NaCMC/glu	0,50	0,25

Composition	Mélange natif à pH 7,0	Mélange dénaturé à pH 7,0
	α (°)	α (°)
G	0,25	0,00
G/NaCMC	0,25	0,00
G/NaCMC/NaCl	0,00	0,00
G/NaCMC/CaCl ₂	-0,25	-0,25
G/NaCMC/glu	0,00	0,00

Tableau A3.16. Les valeurs de l'angle de rotation de la NaCMC native et à différents pH ainsi que du NaCl, CaCl₂ et du glucose.

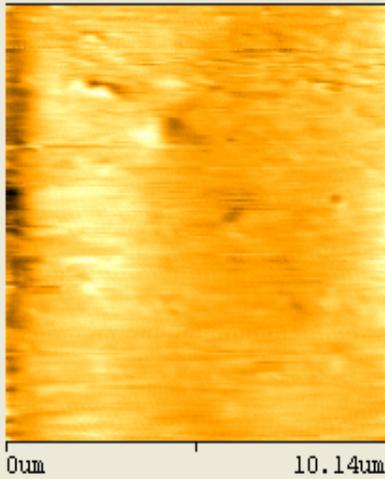
Composition	α (°)
NaCMC _{native}	-0,25
NaCMC _{pH 4.2}	0,25
NaCMC _{pH 5.2}	0,00
NaCMC _{pH 7.0}	-0,25
NaCl	-0,50
CaCl ₂	0,25
glucose	0,25

Annexe 4

Microscope à force atomique

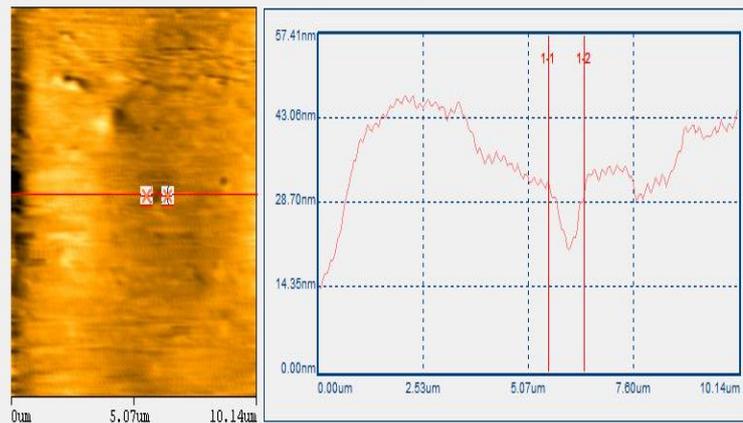
(AFM)

Roughness Measurement



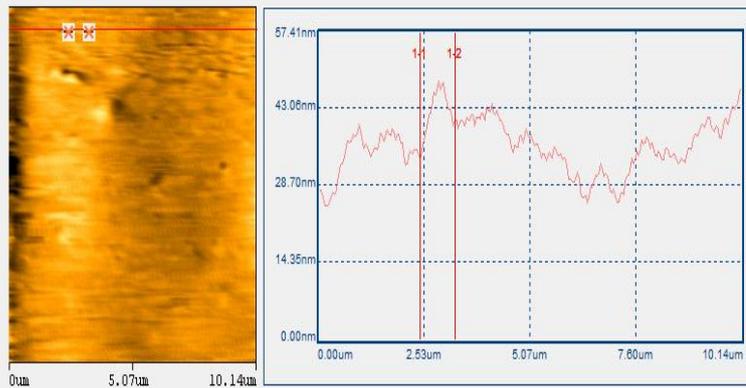
	Whole Area
Total Area St.	103.5909 um ²
Roughness Avg. Sa:	4.2507 nm
Root mean square Sq:	5.6050 nm
Ten Points Height Sz:	53.4024 nm
Range Sr:	57.4070 nm

Line Analysis



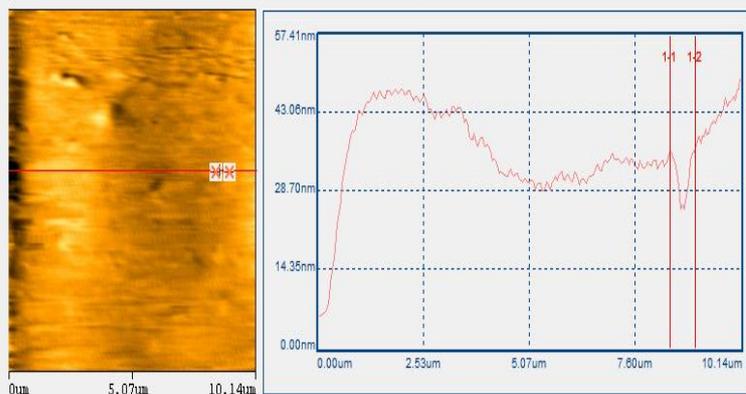
		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	5.560	31.890	Roughness Avg. Ra:	5.95 nm
	2	6.424	30.900	Root mean square Rq:	7.39 nm
	distance	0.864	-0.990	Ten Points Height Rz:	17.61 nm
	pt.angle	-0.07 °		Range Rr:	32.70 nm

Line Analysis



		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line 1	1	2.429	33.870	Roughness Avg. Ra:	4.03 nm
	2	3.247	40.683	Root mean square Rq:	5.09 nm
	distance	0.818	6.813	Ten Points Height Rz:	14.32 nm
	pt. angle	0.48 °		Range Rr:	23.32 nm

Line Analysis



		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line 1	1	8.456	35.913	Roughness Avg. Ra:	6.36 nm
	2	9.040	36.527	Root mean square Rq:	8.31 nm
	distance	0.584	0.613	Ten Points Height Rz:	18.17 nm
	pt. angle	0.06 °		Range Rr:	43.97 nm

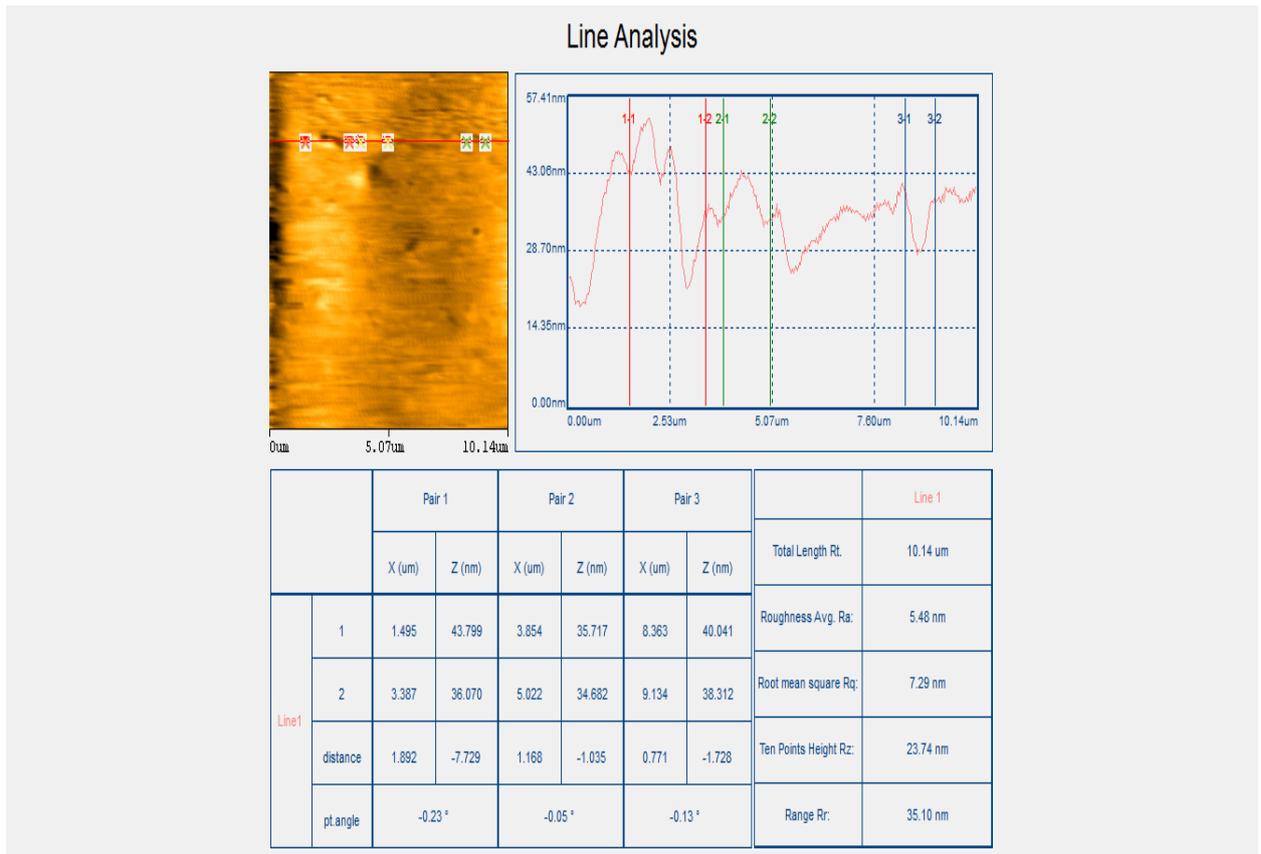


Figure A4.1: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules de la gélatine native.

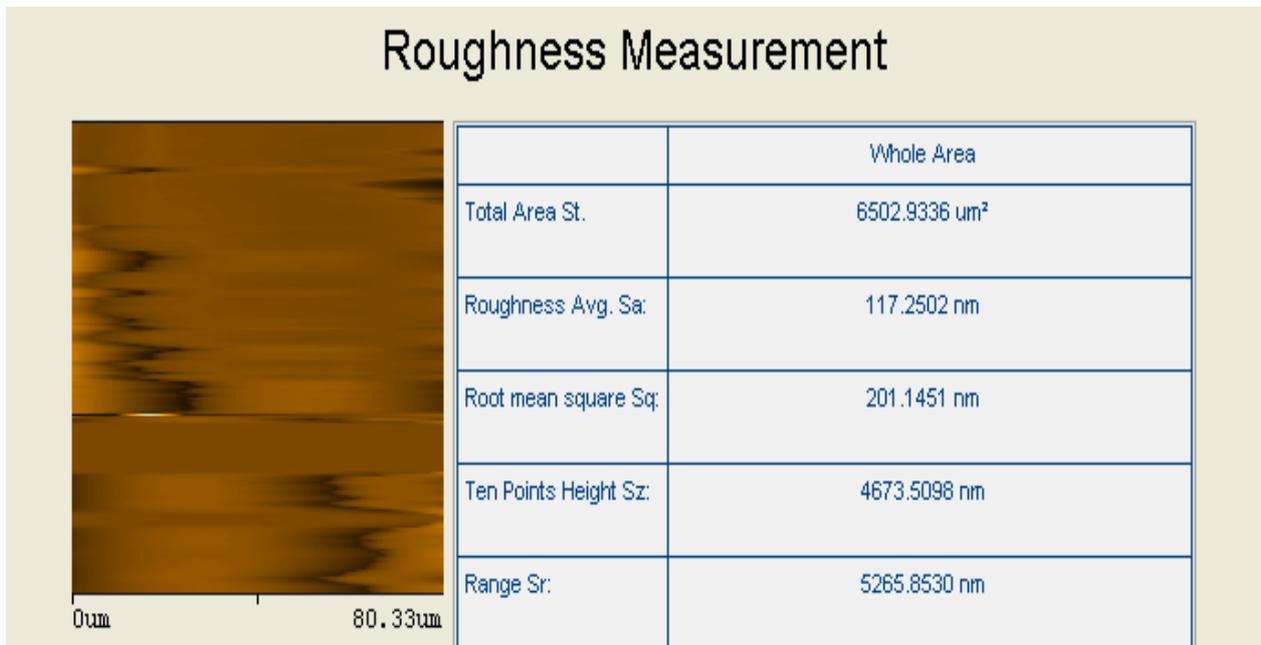
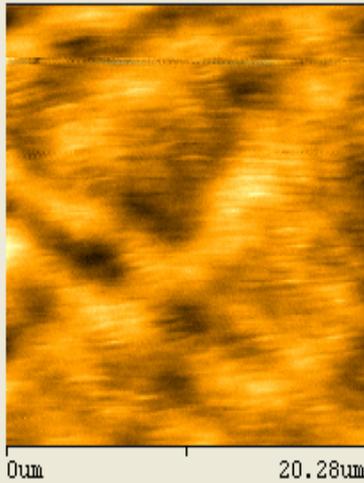


Figure A4.2: Image par AFM et les valeurs de Ra et Rq de la NaCMC native.

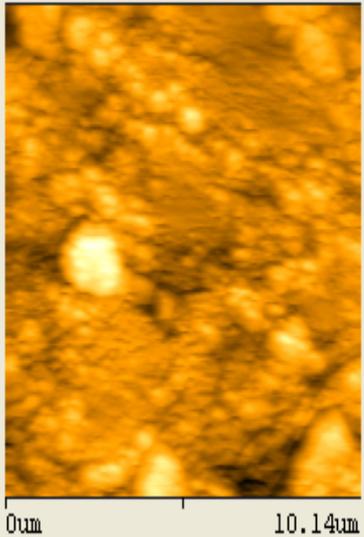
Roughness Measurement



	Whole Area
Total Area St.	414.3636 μm^2
Roughness Avg. Sa:	8.3036 μm
Root mean square Sq:	10.3288 μm
Ten Points Height Sz:	68.9097 μm
Range Sr:	91.2489 μm

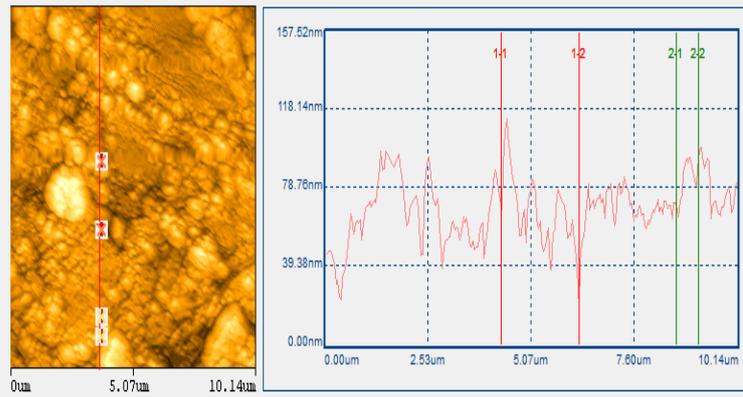
Figure A4.3: Image par AFM et les valeurs de Ra et Rq du mélange (G/NaCMC)_n.

Roughness Measurement



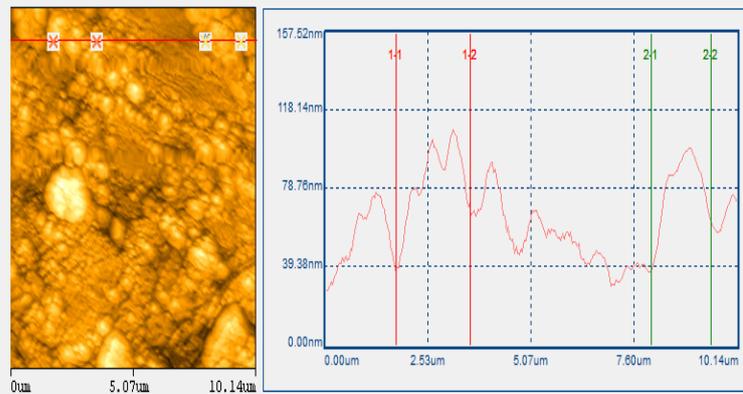
	Whole Area
Total Area St.	103.5909 μm^2
Roughness Avg. Sa:	16.2607 nm
Root mean square Sq:	21.9631 nm
Ten Points Height Sz:	191.4072 nm
Range Sr:	202.0015 nm

Line Analysis



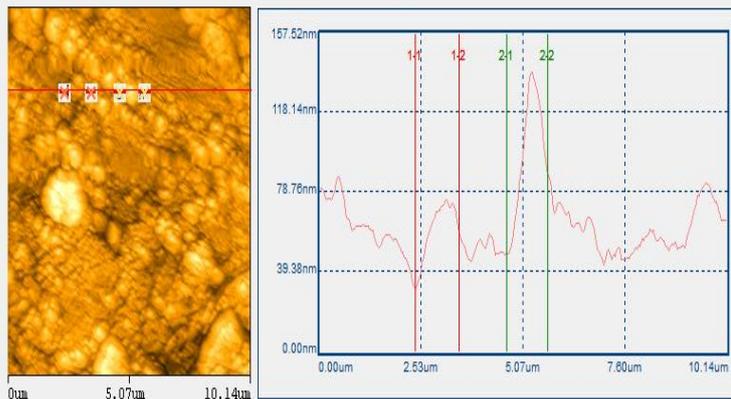
		Pair 1		Pair 2		Pair 3		Line 1	
		Y (um)	Z (nm)	Y (um)	Z (nm)	Y (um)	Z (nm)	Total Length Rt:	10.14 um
Line1	1	4.331	68.464	8.663	68.354			Roughness Avg. Ra:	12.28 nm
	2	6.259	27.849	9.210	95.230			Root mean square Rq:	15.97 nm
	distance	1.928	-40.615	0.547	26.877			Ten Points Height Rz:	58.67 nm
	pt.angle	-1.21 °		2.81 °				Range Rr:	96.57 nm

Line Analysis



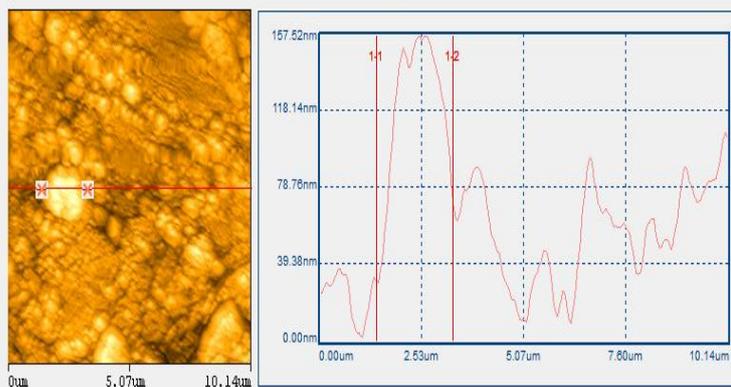
		Pair 1		Pair 2		Pair 3		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt:	10.14 um
Line1	1	1.737	38.963	8.044	38.202			Roughness Avg. Ra:	17.20 nm
	2	3.546	70.413	9.519	62.296			Root mean square Rq:	20.41 nm
	distance	1.809	31.450	1.476	24.094			Ten Points Height Rz:	58.69 nm
	pt.angle	1.00 °		0.94 °				Range Rr:	81.36 nm

Line Analysis



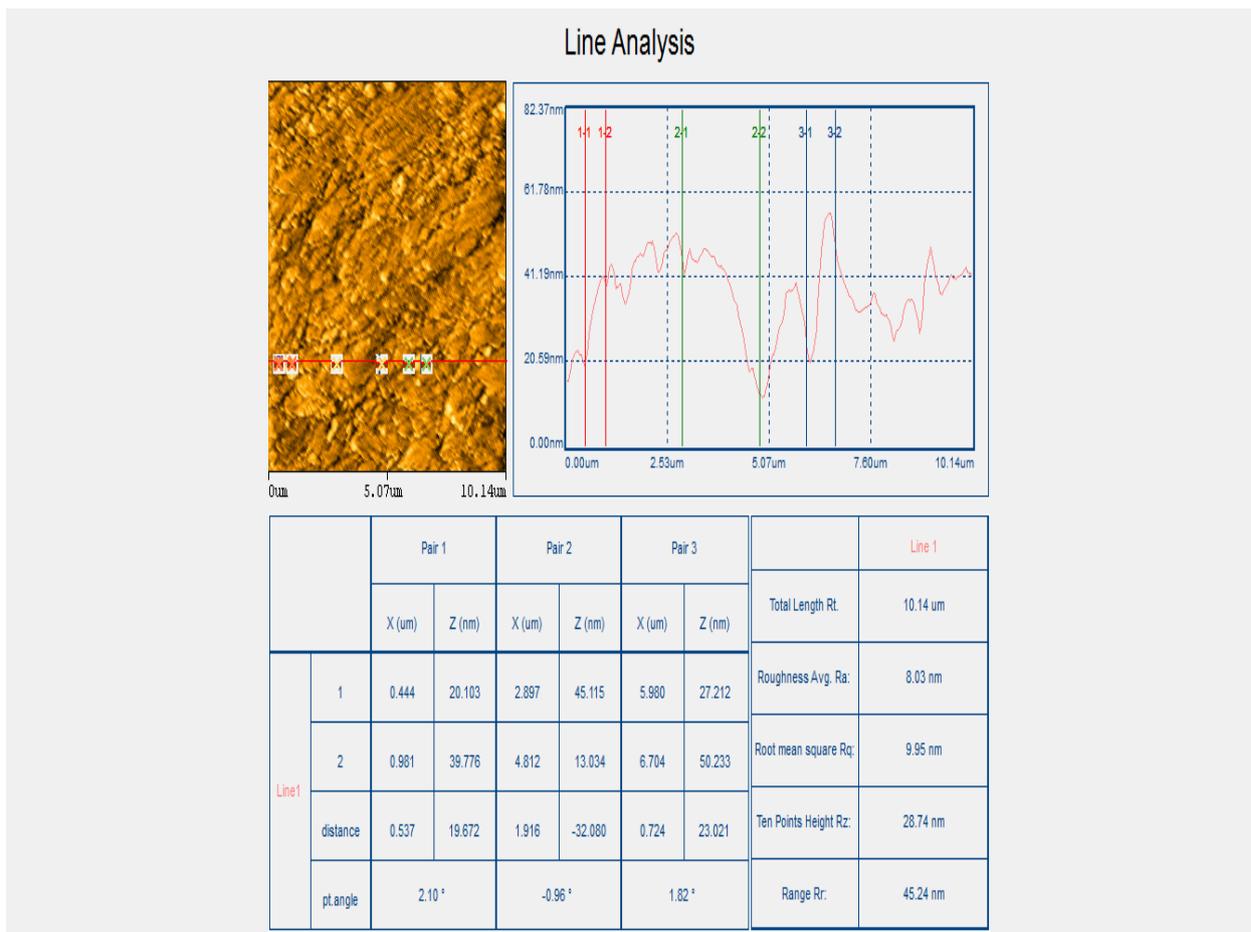
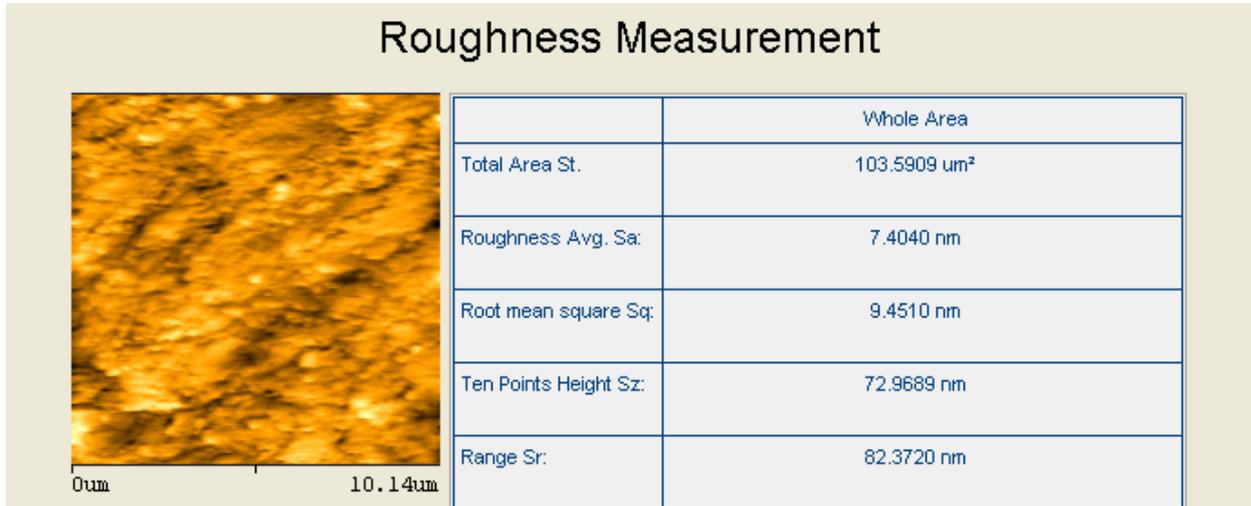
		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	2.356	31.549	4.665	48.581	Roughness Avg. Ra:	13.37 nm
	2	3.475	57.955	5.688	87.619	Root mean square Rq:	18.78 nm
	distance	1.119	26.405	1.023	39.239	Ten Points Height Rz:	47.88 nm
	pt angle	1.35 °		2.20 °		Range Rr:	107.08 nm

Line Analysis

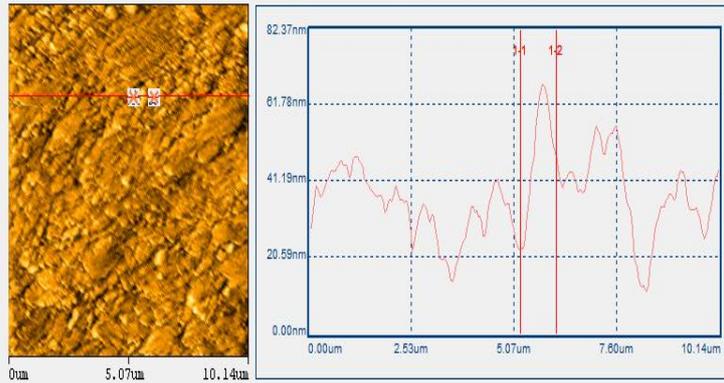


		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	1.404	30.507	Roughness Avg. Ra:	31.66 nm
	2	3.308	70.456	Root mean square Rq:	39.92 nm
	distance	1.904	39.949	Ten Points Height Rz:	115.68 nm
	pt angle	1.20 °		Range Rr:	155.75 nm

Figure A4.4: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange ($G_n/NaCl$).

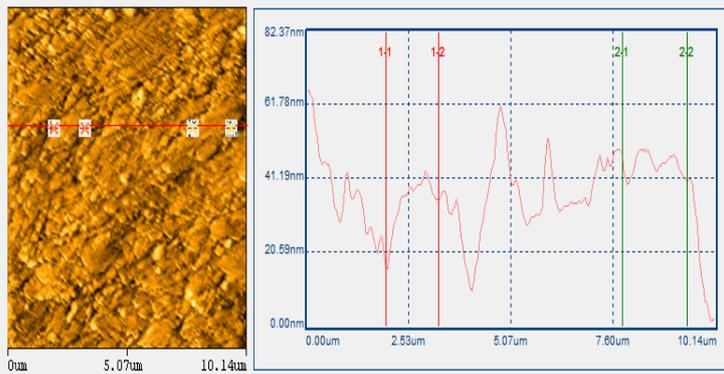


Line Analysis



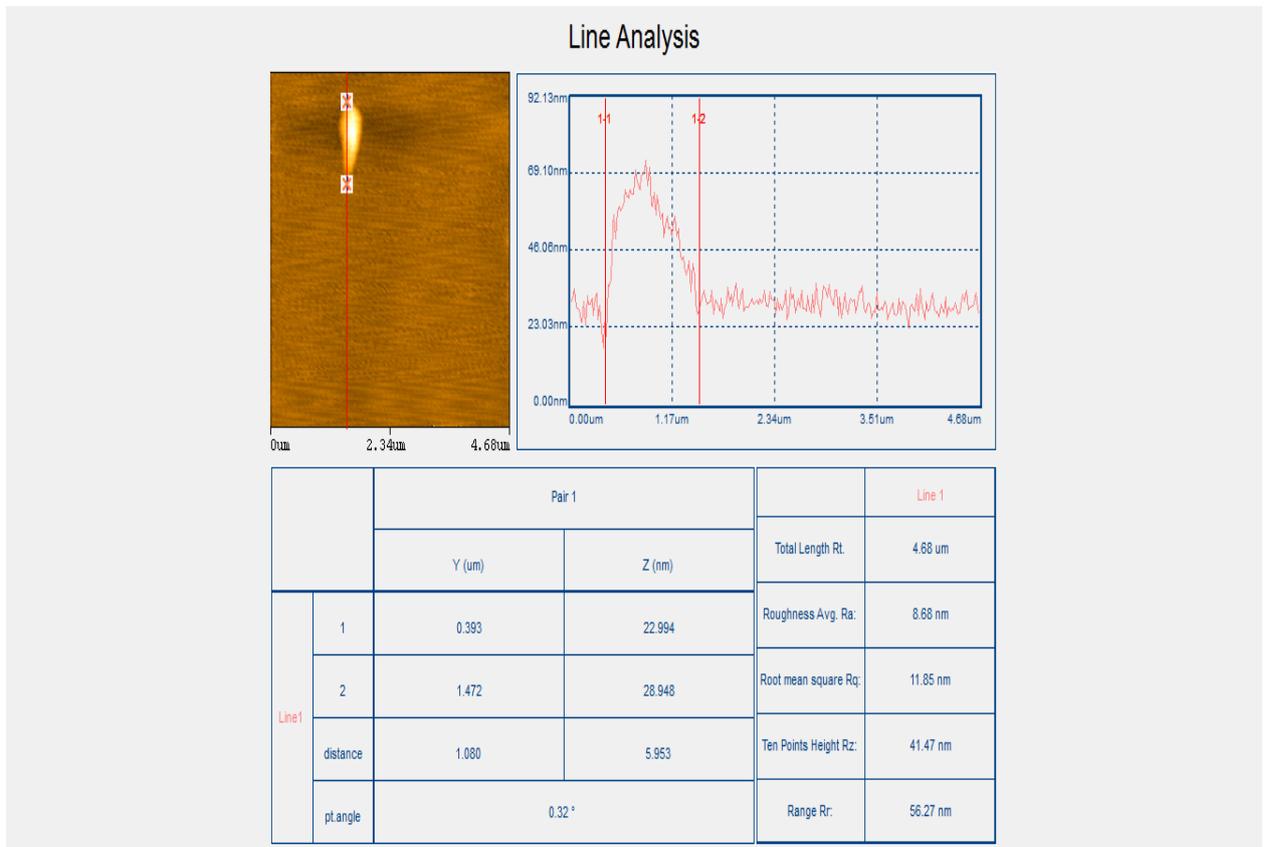
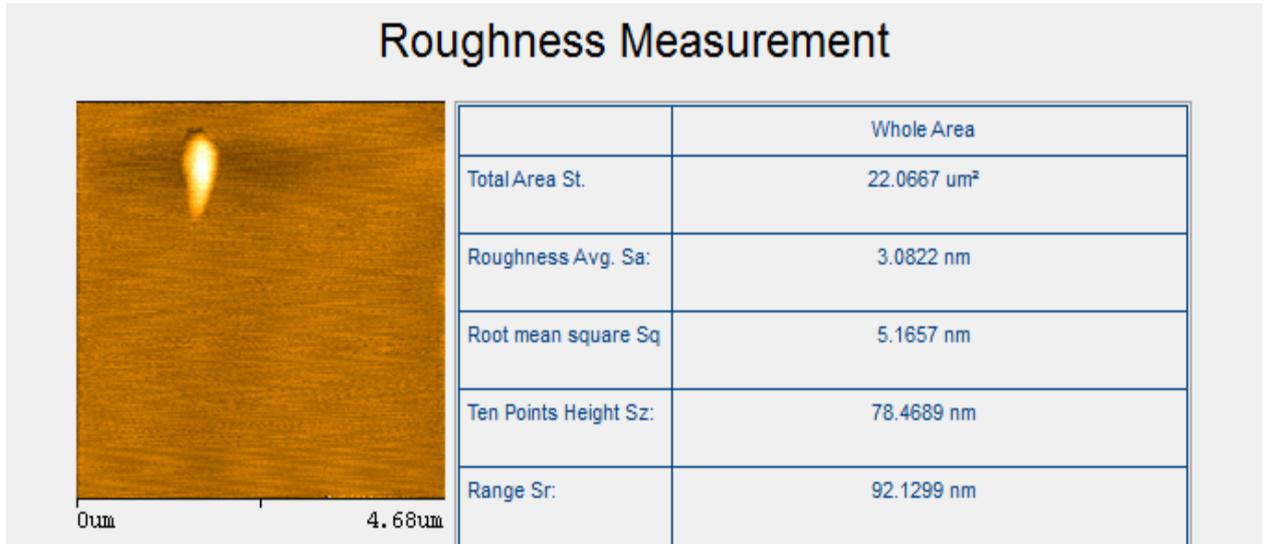
		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	5.233	23.093	Roughness Avg. Ra:	8.37 nm
	2	6.120	47.264	Root mean square Rq:	10.98 nm
	distance	0.888	24.171	Ten Points Height Rz:	33.11 nm
	pt.angle	1.56 °		Range Rr:	56.27 nm

Line Analysis



		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	1.962	16.295	7.826	48.284	Roughness Avg. Ra:	8.74 nm
	2	3.247	35.355	9.461	40.689	Root mean square Rq:	11.64 nm
	distance	1.285	19.061	1.635	-7.595	Ten Points Height Rz:	30.99 nm
	pt.angle	0.85 °		-0.27 °		Range Rr:	64.63 nm

Figure A4.5: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange (G/NaCMC)_n/NaCl.



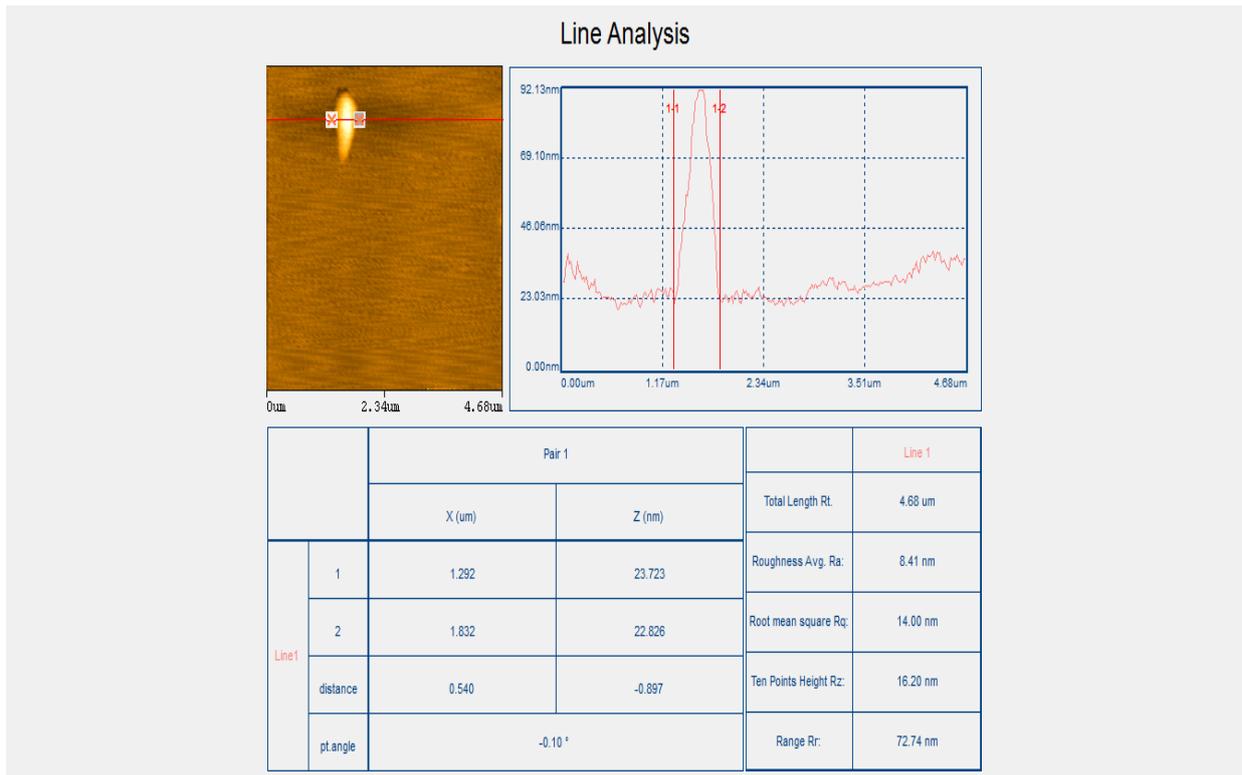


Figure A4.6: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange $(G/NaCMC)_n / CaCl_2$.

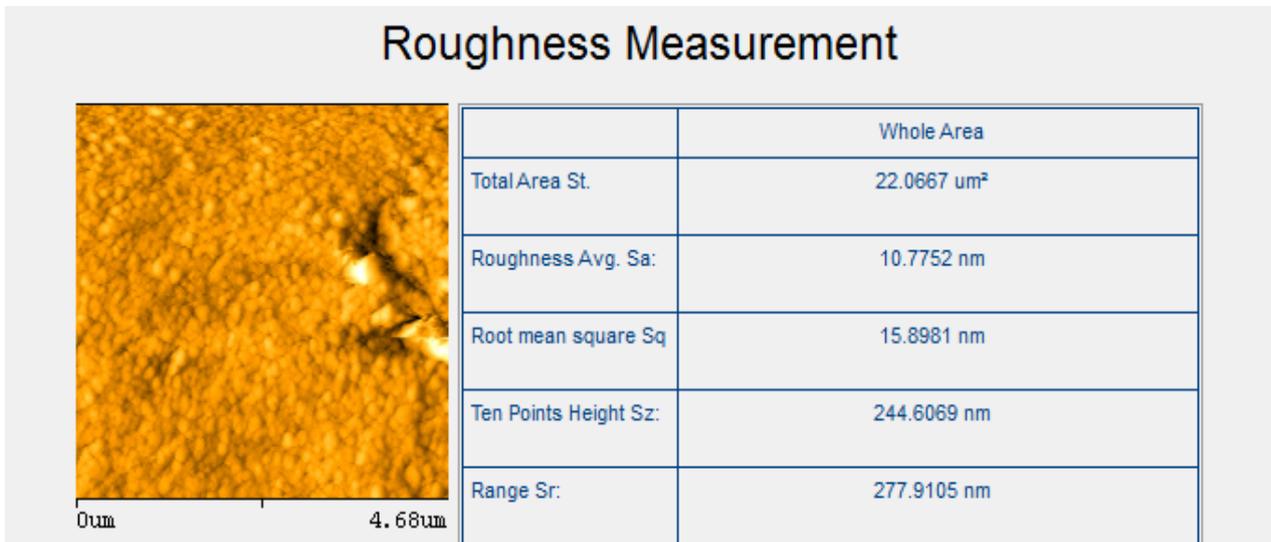
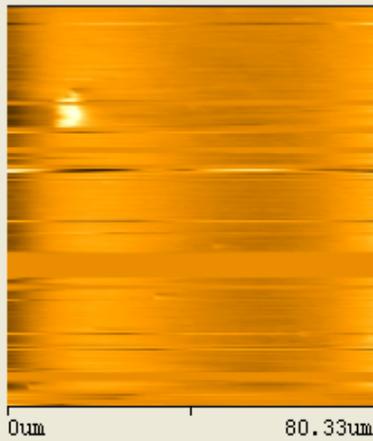


Figure A4.7: Image par AFM et les valeurs de Ra et Rq du mélange $(G/NaCMC)_n /$ glucose.

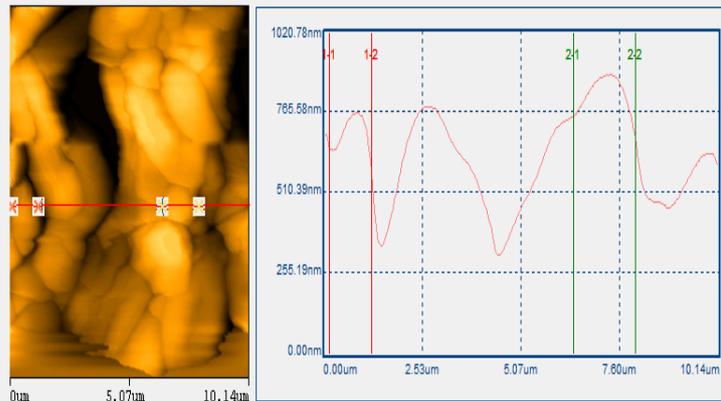
Roughness Measurement



	Whole Area
Total Area St.	6502.9336 um ²
Roughness Avg. Sa:	49.8387 nm
Root mean square Sq:	73.4155 nm
Ten Points Height Sz:	1131.2086 nm
Range Sr:	1161.3187 nm

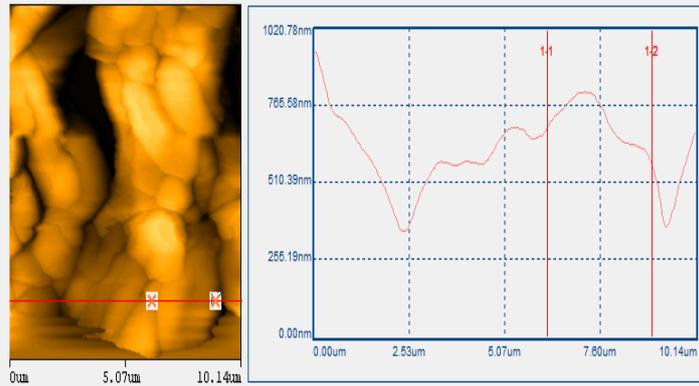
Figure A4.8: Image par AFM et les valeurs de Ra et Rq de la gélatine à pH 4,2 ($G_{pH\ 4,2}$).

Line Analysis



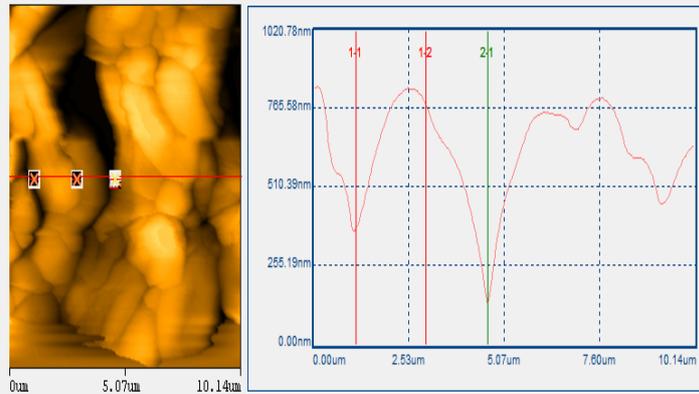
		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line 1	1	0.097	662.313	6.427	756.328	Roughness Avg. Ra:	125.98 nm
	2	1.188	591.014	8.004	689.390	Root mean square Rq:	149.78 nm
	distance	1.091	-71.299	1.577	-66.938	Ten Points Height Rz:	393.69 nm
	pt.angle	-3.74 °		-2.43 °		Range Rr:	574.20 nm

Line Analysis



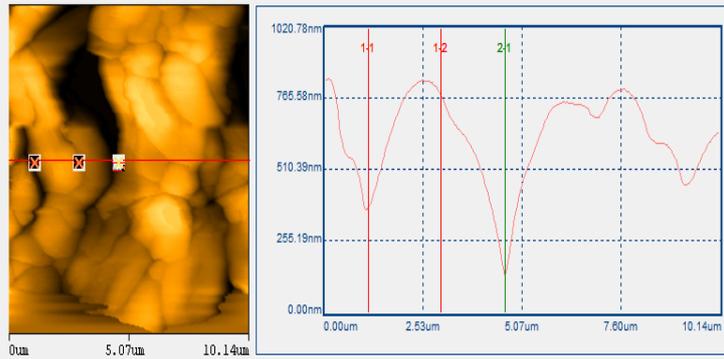
		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	6.196	696.867			Roughness Avg. Ra:	99.82 nm
	2	8.974	577.928			Root mean square Rq:	126.07 nm
	distance	2.779	-118.940			Ten Points Height Rz:	288.95 nm
	pt.angle	-2.45 °				Range Rr:	598.40 nm

Line Analysis



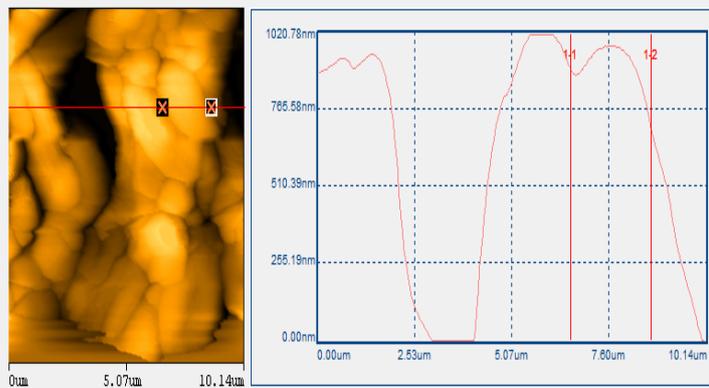
		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	1.091	373.732	4.608	132.890	Roughness Avg. Ra:	125.95 nm
	2	2.959	786.438			Root mean square Rq:	155.91 nm
	distance	1.868	412.706			Ten Points Height Rz:	410.05 nm
	pt.angle	12.46 °				Range Rr:	708.78 nm

Line Analysis



		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	1.091	373.732	4.608	132.890	Roughness Avg. Ra:	125.95 nm
	2	2.959	786.438			Root mean square Rq:	155.91 nm
	distance	1.868	412.706			Ten Points Height Rz:	410.05 nm
	pt.angle	12.46 °				Range Rr:	708.78 nm

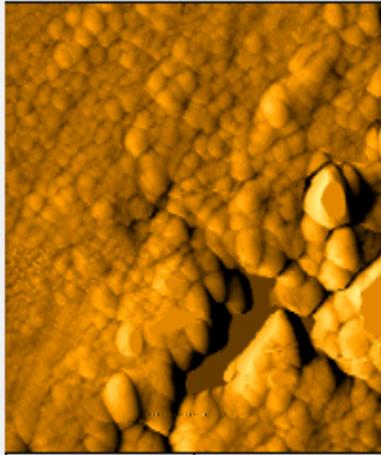
Line Analysis



		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	6.609	903.910	Roughness Avg. Ra:	341.03 nm
	2	8.711	711.145	Root mean square Rq:	380.06 nm
	distance	2.103	-192.765	Ten Points Height Rz:	122.99 nm
	pt.angle	-5.24 °		Range Rr:	1020.78 nm

Figure A4.9: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange (G/NaCMC)_{pH 4,2}.

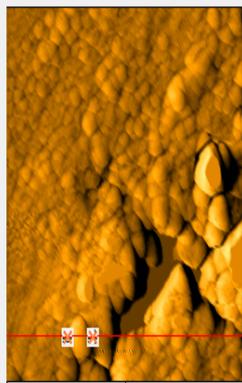
Roughness Measurement



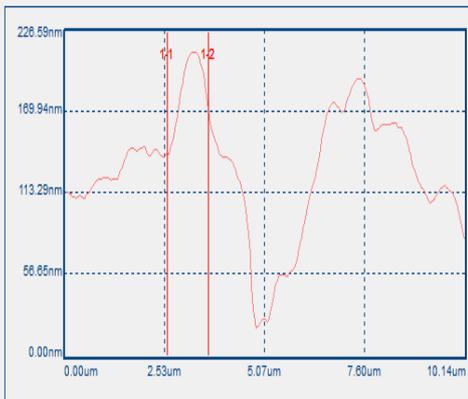
0um 10.14um

	Whole Area
Total Area St.	103.5909 μm^2
Roughness Avg. Sa:	27.7009 nm
Root mean square Sq	40.9724 nm
Ten Points Height Sz:	221.7201 nm
Range Sr:	226.5864 nm

Line Analysis

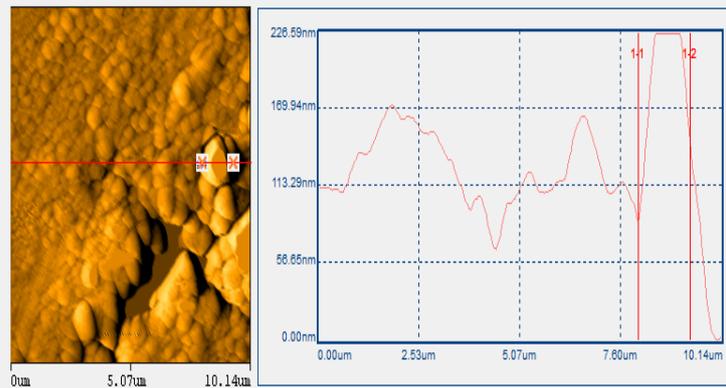


0um 5.07um 10.14um



		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line1	1	2.594	140.980	Roughness Avg. Ra:	33.72 nm
	2	3.641	168.812	Root mean square Rq:	43.82 nm
	distance	1.047	27.832	Ten Points Height Rz:	118.06 nm
	pt.angle	1.52 °		Range Rr:	193.51 nm

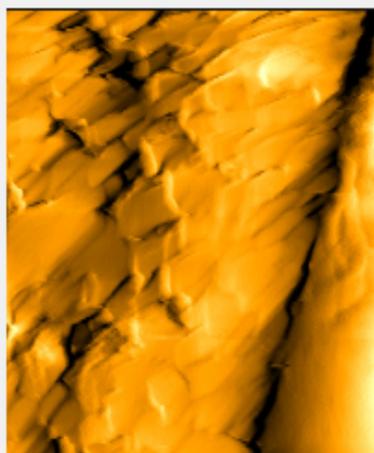
Line Analysis



		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 um
Line 1	1	8.060	89.543	Roughness Avg. Ra:	32.93 nm
	2	9.372	142.872	Root mean square Rq:	44.28 nm
	distance	1.313	53.329	Ten Points Height Rz:	85.82 nm
	pt.angle	2.33 °		Range Rr:	226.59 nm

Figure A4.10: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange (G/NaCMC) pH 4,2/NaCl.

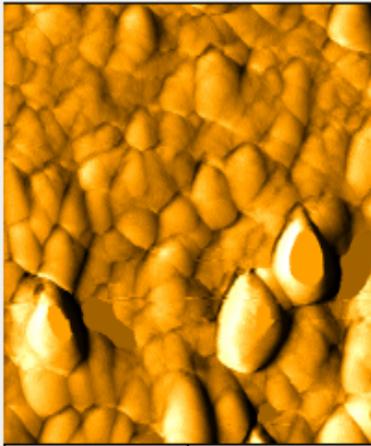
Roughness Measurement



	Whole Area
Total Area St.	22.0667 um²
Roughness Avg. Sa:	41.2948 nm
Root mean square Sq	50.9966 nm
Ten Points Height Sz:	380.6348 nm
Range Sr:	409.4523 nm

Figure A4.11: Image par AFM et les valeurs de Ra et Rq du mélange (G/NaCMC) pH 4,2 /CaCl₂.

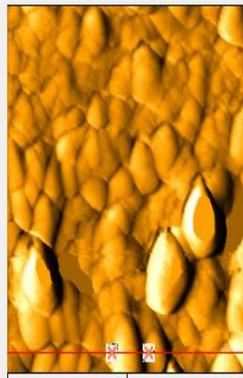
Roughness Measurement



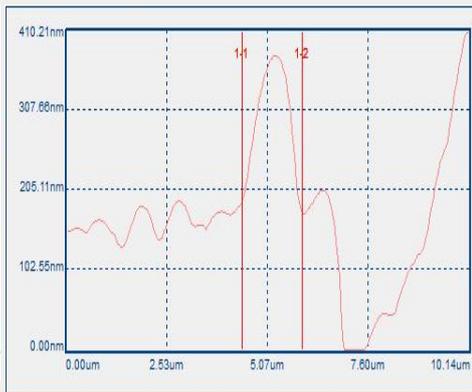
0um 10.14um

	Whole Area
Total Area St.	103.5909 um ²
Roughness Avg. Sa:	55.1343 nm
Root mean square Sq	76.8243 nm
Ten Points Height Sz:	400.7082 nm
Range Sr:	410.2126 nm

Line Analysis

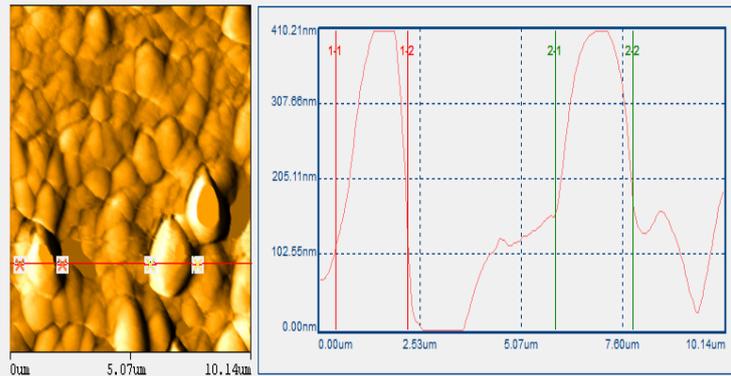


0um 5.07um 10.14um



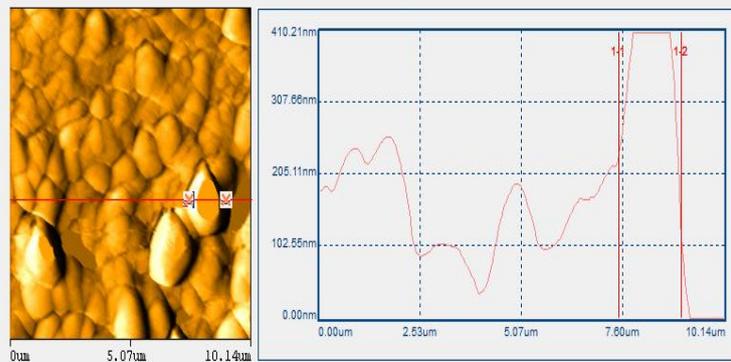
		Pair 1		Line 1	
		X (um)	Z (nm)	Total Length Rt:	10.14 um
Line1	1	4.413	189.668	Roughness Avg. Ra:	66.45 nm
	2	5.944	177.127	Root mean square Rq:	95.33 nm
	distance	1.532	-12.541	Ten Points Height Rz:	102.12 nm
	pt.angle	-0.47 °		Range Rr:	410.21 nm

Line Analysis



		Pair 1		Pair 2		Line 1	
		X (μm)	Z (nm)	X (μm)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 μm
Line 1	1	0.405	116.294	5.902	155.813	Roughness Avg. Ra:	113.17 nm
	2	2.189	147.932	7.854	183.366	Root mean square Rq:	135.13 nm
	distance	1.785	31.639	1.951	27.553	Ten Points Height Rz:	-23.58 nm
	pt.angle	1.02 °		0.81 °		Range Rr:	410.21 nm

Line Analysis



		Pair 1		Line 1	
		X (μm)	Z (nm)	Total Length Rt.	10.14 μm
Line 1	1	7.512	234.739	Roughness Avg. Ra:	86.68 nm
	2	9.081	121.834	Root mean square Rq:	111.21 nm
	distance	1.568	-113.104	Ten Points Height Rz:	122.81 nm
	pt.angle	-4.13 °		Range Rr:	410.21 nm

Figure A4.12: Image par AFM, les valeurs de Ra et Rq et les dimensions des différentes particules du mélange (G/NaCMC) pH 4,2 /glucose.

Résumé

La complexation des biopolymères et la compréhension du mécanisme de formation des complexes dans différentes conditions de milieu sont essentielles si l'on veut prévoir et améliorer les propriétés techno fonctionnelles des complexes. En effet, il a été montré que les propriétés fonctionnelles des biopolymères complexés étaient supérieures à celles des biopolymères seuls et que les domaines d'utilisation de ces assemblages macromoléculaires complexes étaient multiples.

Le but est de comprendre les mécanismes possibles mis en jeu en fonction de la nature des mélanges obtenus. D'un point de vue fondamental, il est clair que l'effet protecteur de la carboxyméthylcellulose sodique sur la gélatine et les modifications conformationnelles de l'hélice- α sont fortement influencés par la nature du milieu. L'objectif de ce travail est de minimiser au maximum les changements de structure de l'hélice- α pour maintenir la gélatine plus stable et la protéger contre la dénaturation qui se manifeste durant les procédés de transformations notamment dans le domaine alimentaire. Ceci peut être suivi par différentes méthodes spectrales et microscopiques telles que l'UV-Vis, diagrammes de phases, électrophorèse, IRTF, DRX, polarimétrie et AFM.

Mots Clefs : gélatine, carboxyméthylcellulose sodique, hélice α , IRTF, DRX, polarimétrie et AFM.

Résumé

La complexation des biopolymères et la compréhension du mécanisme de formation des complexes dans différentes conditions de milieu sont essentielles si l'on veut prévoir et améliorer les propriétés techno fonctionnelles des complexes. En effet il a été montré que les propriétés fonctionnelles des biopolymères complexés étaient supérieures à celles des biopolymères seuls et que les domaines d'utilisation de ces assemblages macromoléculaires complexes étaient multiples.

Le but est de comprendre les mécanismes possibles mis en jeu en fonction de la nature des mélanges obtenus. D'un point de vue fondamental, il est clair que l'effet protecteur de la carboxyméthylcellulose sodique sur la gélatine et les modifications conformationnelles de l'hélice- α sont fortement influencés par la nature du milieu. L'objectif de ce travail est de minimiser au maximum les changements de structure de l'hélice- α pour maintenir la gélatine plus stable et la protéger contre la dénaturation qui se manifeste durant les procédés de transformations notamment dans le domaine alimentaire. Ceci peut être suivi par différentes méthodes spectrales et microscopiques telles que l'UV-Vis, diagrammes de phase, électrophorèse, IRTF, DRX, polarimétrie et AFM.

Mots Clefs : gélatine, carboxyméthylcellulose sodique, hélice- α , IRTF, DRX, polarimétrie et AFM.

Abstract

Biopolymer complexation and understanding of the complex formation mechanism in different environmental conditions are essential for preventing and improving techno-functional properties of complexes. Indeed, the functional properties of complexed biopolymers were shown to be higher than those of biopolymers alone, and the use fields of these complex macromolecular assemblies are multiple.

The aim of this work is to understand the possible mechanisms used depending on the nature of the obtained mixtures. According to a fundamental point of view, it is obvious that the protecting effect of sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) on gelatin and the α -helix conformational modifications are strongly influenced by the nature of the medium. The objective of this work is to minimize as possible the structure changes of α -helix to maintain gelatin more stable and to protect it against denaturation that appears during the transformation processes especially in the food industry. This may be followed by various spectral and microscopic methods such as UV-Vis, phase diagrams, electrophoresis, FTIR, XRD, polarimetry and AFM.

Keywords: gelatin, sodium carboxymethylcellulose, α -helix, FTIR, XRD, polarimetry and AFM.

ملخص

تركيب البوليمرات الحيوية، فهم آلية تشكيل المركبات في الظروف البيئية المختلفة أمر ضروري إذا كنا نريد التنبؤ وتحسين الخواص التقنية-الوظيفية للمعقدات. في الواقع قد تبين أن الخصائص الوظيفية للبوليمرات الحيوية المركبة كانت أعلى من البوليمرات الحيوية وحدها، وأن استخدام هذه التشكيلات المعقدة متعددة. الهدف هو فهم الآليات الممكنة التحصل عليها اعتماداً على طبيعة الخلائط المتحصل عليها. ومن ناحية أساسية، من المتضح أن التأثير الوقائي للكربوكسي ميثيل سلولوز الصوديوم على الجيلاتين والتغيرات المتعلقة بالحلزون α متأثرة جداً بنوعية المحيط.

هدفنا هو تقليل التغيرات في هيكل الحلزون α للحفاظ على الجيلاتين أكثر استقراراً وحمايتها ضد التمسح الذي يحدث أثناء عملية التحول خصوصاً في قطاع الأغذية. يمكن اتباع كل هذا، بواسطة مختلف الطرق الطيفية والمجهريّة مثل UV-vis، مخططات المرحلة، الرحلان الكهربائي، FTIR، XRD، الاستقطاب، AFM.

الكلمات المفتاحية: الجيلاتين، الكربوكسي ميثيل سلولوز الصوديوم، الحلزون α ، IRTF، DRX، الاستقطاب وAFM.